

N° / / / / / / / / / / / / / / / /

THÈSE

pour obtenir le grade de

Docteur

de

**l'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement
(Agro Paris Tech)**

*présentée et soutenue publiquement
par*

Jacques-Antoine HENNEKINNE

Le 8 juillet 2009

**NOUVELLES APPROCHES POUR LA CARACTERISATION DES TOXI INFECTIONS ALIMENTAIRES A
STAPHYLOCOQUES A COAGULASE POSITIVE**

Directeur de thèse : Sylviane DRAGACCI

*Travail réalisé à l'AFSSA LERQAP, Unité Caractérisation des toxines, équipe toxines
bactériennes,*

F - 94700 Maisons Alfort,

Devant le jury :

M. le Professeur Olivier CERF, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort	Président
M. le Professeur Georges DAUBE, Université de Liège	Rapporteur
M. le Docteur Gérard LINA, Centre National de Référence des Staphylocoques	Rapporteur
Mme le Docteur Sylviane DRAGACCI, AFSSA LERQAP	Examineur
M. Le Docteur Emmanuel JAMET, ACTILAT	Examineur

Remerciements

Je tenais tout d'abord à vivement remercier Laurent Rosso et Laurent Laloux, directeurs successifs du laboratoire d'études et de recherches sur la qualité des aliments et des procédés agro-alimentaires (LERQAP) pour leur confiance et les moyens qu'ils ont mis à disposition pour réaliser dans les meilleures conditions les travaux de cette thèse.

Je tenais également à exprimer ma profonde gratitude au Docteur Sylviane Dragacci, ma directrice de thèse, qui a cru en ce projet et a su me porter et me guider tout au long de ce dernier et au Docteur Sophie Krys, ma chef d'unité, pour m'avoir supporté tout au long de cette thèse.

J'adresse mes sincères remerciements aux Professeurs Olivier Cerf, Georges Daube et aux Docteurs Gérard Lina et Emmanuel Jamet qui ont accepté d'évaluer mon travail en acceptant de participer à mon jury.

Un immense merci à toute l'équipe des toxines bactériennes de l'unité Caractérisation des toxines, Annick Ostyn, Sabine Herbin, Florence Guillier, Sabine Messio, Sylvie Pairaud, Isabelle Papinaud et Amélie Gateaux pour leur aide, leur soutien, leur gentillesse et leur bonne humeur : qu'elles soient aussi toutes remerciées pour leur infinie patience...

Il est va de même pour tous les personnels de l'unité d'Hygiène et de microbiologie des produits alimentaires en particulier Françoise Dilasser et Sylviane Derzelle qui m'ont accueilli dans leurs locaux pour les expérimentations de biologie moléculaire sur les souches de staphylocoques à coagulase positive et pour les personnels de l'unité Caractérisation et épidémiologie bactérienne dont Trinh Tam Dao pour sa très grande disponibilité.

Tous mes remerciements vont aussi au laboratoire d'étude de la dynamique des protéomes (LEDyP) du Commissariat à l'Energie Atomique (CEA) de Grenoble. Que Virginie Brun, Dorothée Lebert, Alain Dupuis et Jérôme Garin soient remerciés pour leur indispensable collaboration et le temps qu'ils ont consacré à m'expliquer la spectrométrie de masse.

Je suis également très reconnaissant au Docteur Marie-Laure De Buyser pour sa gentillesse, sa disponibilité, ses conseils, son intérêt pour mes travaux et nos discussions fructueuses sur les staphylocoques, leurs entérotoxines et les toxico-infections alimentaires collectives.

Je ne saurais oublier mon partenaire de course à pied, Ronel Biré, pour tous les bons et nécessaires moments de détente que nous avons eus au travers de nos différents entraînements et autres courses de longue haleine !

Enfin je désire remercier très sincèrement toute ma famille, mes amis pour leur soutien sans faille, leur encouragement et leur compréhension. Que Gabrielle et Virginie soient particulièrement remerciées. Qu'ils sachent tous à quel point je les aime.

Pour Hedwige, ma mère

Sommaire

Liste des tableaux	7
Liste des figures	8
Liste des abréviations	9
Résumé	12
Préambule	13
Introduction	16
1. Staphylocoques et toxines	16
1.1 Staphylocoques	16
1.1.1 Taxonomie	16
1.1.2 Réservoirs	17
1.1.3 <i>Staphylococcus aureus</i>	19
1.2 Entérotoxines staphylococciques	19
1.2.1 Nomenclature et propriétés	20
1.2.2 Déterminisme génétique et régulation	24
1.2.3 Modes d'action	26
1.2.3.1 L'activité superantigénique	28
1.2.3.2 L'activité émétique	29
1.3 Autres facteurs de virulence de <i>Staphylococcus aureus</i>	31
2. Toxi-infections alimentaires collectives à staphylocoques à coagulase positive	32
2.1 Définition	32
2.2 Historique	33
2.3 Déclaration des épisodes toxiques	35
2.4 Incidence	37
2.4.1 En France	37
2.4.2 En Europe	38
2.4.3 Aux Etats Unis	39
2.4.4 Au Japon	40
2.5 Conditions requises pour déclencher une TIAC à staphylocoques	41
2.5.1 Source de staphylocoques producteurs d'entérotoxines	41
2.5.2 Mode de contamination	43
2.5.3 Aliments favorables	45

2.5.4	Facteurs influençant la croissance et la production d'entérotoxines staphylococciques par <i>Staphylococcus aureus</i>	46
2.5.4.1	Température	46
2.5.4.2	pH	47
2.5.4.3	Activité de l'eau	48
2.5.4.4	Facteurs nutritionnels	48
2.5.5	Ingestion d'une dose suffisante	49
3.	Investigation des toxi-infections alimentaires collectives à staphylocoques	50
3.1	Méthodes de détection de <i>Staphylococcus aureus</i>	50
3.1.1	Isolement de <i>Staphylococcus aureus</i> par microbiologie conventionnelle	50
3.1.1.1	Milieux sélectifs ou non	51
3.1.1.2	Méthodes quantitatives et qualitatives	52
3.1.2	Détection de <i>Staphylococcus aureus</i> par méthodes moléculaires	53
3.1.2.1	Caractérisation moléculaire des souches	53
3.1.2.2	Caractérisation du pouvoir toxigène des souches	54
3.1.3	Méthodes normalisées et alternatives	55
3.1.3.1	Méthodes normalisées	56
3.1.3.2	Méthodes alternatives	57
3.2	Méthodes de recherche des entérotoxines staphylococciques	57
3.2.1	Extraction	58
3.2.1.1	Chromatographie par perméation de gel	58
3.2.1.2	Immunochromatographie	58
3.2.1.3	Concentration des protéines totales	59
3.2.2	Détection	59
3.2.2.1	Les bioessais	59
3.2.2.2	L'outil moléculaire	60
3.2.2.3	L'outil immunochimique	61
3.2.2.3.1	Immunodiffusion en gélose	61
3.2.2.3.2	Méthodes radio-immunologiques	62
3.2.2.3.3	Agglutination passive sur billes de latex	62
3.2.2.3.4	Méthodes immunoenzymatiques	62
3.2.2.4	L'outil physicochimique	64
3.2.2.4.1	Electrophorèse capillaire	64
3.2.2.4.2	Chromatographie liquide haute performance	65
3.2.2.4.3	Nouvelles approches par spectrométrie de masse	66
4.	Réglementation sanitaire staphylocoques et toxines	67
4.1	Le paquet hygiène	67
4.2	Règlements N2073/2005 et N1441/2007 et critères microbiologiques pour les staphylocoques à coagulase positive et les entérotoxines staphylococciques	69
4.3	Laboratoires Communautaire et National de référence	72
4.3.1	Missions	72

Enjeux et objectifs de la caractérisation des toxi-infections alimentaires collectives à staphylocoques à coagulase positive 74

1.1	Enjeux	74
1.1.1	Enjeux scientifiques	74
1.1.2	Enjeux techniques	75
1.1.3	Enjeux sanitaires	75
1.2	Objectifs des travaux	76

Présentation des travaux 79

1.	Amélioration des méthodes de détection des entérotoxines staphylococciques	79
2.	Caractérisation des souches de Staphylocoques à coagulase positive	82
2.1	Origine des souches et potentiel toxinogène	82
2.1.1	Etude des souches isolées d'épisodes toxiques et génotypage <i>sea</i> à <i>sei</i>	83
2.1.2	Génotypage <i>sej</i> à <i>seu</i>	86
2.2	Production d'entérotoxines staphylococciques en surnageants de culture et en matrices alimentaires par les souches de <i>S. aureus</i> isolées d'épisodes toxiques	90
3.	Caractérisation et quantification de l'entérotoxine staphylococcique de type A (SEA) par spectrométrie de masse	94
3.1	Quantification d'une solution commerciale d'entérotoxine de type SEA	96
3.2	Quantification de l'entérotoxine de type SEA en matrice alimentaire modèle	98
4.	Mise en œuvre de la démarche intégrée pour caractériser une toxi infection alimentaire collective	100

Conclusion et perspectives 103

Liste des travaux 106

Publications 108

Références bibliographiques 155

Annexes 174

Liste des tableaux

Tableau 1 : Espèces et sous-espèces décrites au sein du genre *Staphylococcus*

Tableau 2 : Caractéristiques majeures des entérotoxines staphylococciques

Tableau 3 : Résistance de *Staphylococcus aureus* et des entérotoxines au traitement thermique

Tableau 4 : Support génétique des gènes d'entérotoxines staphylococciques

Tableau 5 : Activités superantigénique et émétique des entérotoxines staphylococciques

Tableau 6 : pH minimum pour la production d'entérotoxines staphylococciques dans différents milieux

Tableau 7 : Effet des facteurs nutritionnels sur la production d'entérotoxines staphylococciques par *Staphylococcus aureus*

Tableau 8 - Milieux sélectifs pour la détection de *Staphylococcus aureus* : exemple des différents agents sélectifs utilisés et des différents caractères recherchés

Tableau 9 : Modifications apportées au milieu de Baird-Parker

Tableau 10 : Méthodes PCR utilisées pour la détection de gènes de *Staphylococcus aureus* dans l'ADN extrait d'aliments contaminés

Tableau 11 : Caractéristiques des kits commerciaux de détection des entérotoxines staphylococciques

Tableau 12 : Critère *Staphylococcus aureus* d'hygiène des procédés

Tableau 13 : Critère de sécurité entérotoxines staphylococciques

Tableau 14 : Amorces utilisées pour les réactions de PCR des gènes *sej* à *seu*

Tableau 15 : Résultats du génotypage *sea* à *seu* des souches de *S. aureus*

Tableau 16 : Résultats de l'électrophorèse 2D-MS sur les surnageants de souches de *S. aureus*

Tableau 17 : Résultats obtenus pour le génotypage de souches, la détection et la quantification de la toxine SEA par ELISA et méthode PSAQ dans une matrice fromagère modèle

Tableau 18 : Résultats obtenus pour le génotypage de souches, la détection et la quantification de la toxine SEA par ELISA et méthode PSAQ dans la matrice perle de coco

Liste des figures

Figure 1 : Aspect de *Staphylococcus aureus* suite à une coloration de Gram

Figure 2 : Aspect de *Staphylococcus aureus* en microscopie électronique

Figure 3 : Représentation schématique des interactions entre toxines bactériennes et cellules eucaryotes

Figure 4 : Structure tridimensionnelle de l'entérotoxine de type SEC

Figure 5 : Activation spécifique et non-spécifique des lymphocytes T

Figure 6 : Facteurs de virulence de *Staphylococcus aureus*

Figure 7 : Système de déclaration des toxi-infections alimentaires collectives au niveau français

Figure 8 : Système de déclaration des toxi-infections alimentaires collectives au niveau européen

Figure 9 : Nombres de foyers toxi-infections alimentaires collectives à *Staphylococcus aureus*, période 1996-2007, France

Figure 10 : Schéma d'une chaîne de contamination depuis un lait de brebis atteinte d'une mammites subclinique à staphylocoques jusqu'au produit fromager final

Figure 11 : Détails des doses ingérées par 44 malades en fonction de leur sexe (31 Femmes / 13 Hommes) et âge

Figure 12 : Action émétique de l'entérotoxine de type SEA après ingestion par des musaraignes

Figure 13 : Représentation schématique du principe de l'immuno-PCR

Figure 14 : Exemple de plaque de quantification de la toxine SEA

Figure 15 : Architecture du paquet hygiène (NS/DGAL/SDSSA/N2004-8193 du 28 juillet 2004)

Figure 16 : Analyses à mettre en œuvre pour élucider les épisodes toxiques où *Staphylococcus aureus* et ses entérotoxines étaient suspectés

Figure 17 : Méthodologie utilisée pour investiguer les toxi-infections alimentaires collectives à staphylocoques (PCR et PFGE)

Figure 18 : Méthodologie utilisée pour caractériser les souches de *S. aureus* isolées de toxi-infections alimentaires collectives (Immunochimie et 2D – MS)

Figure 19 : Chromatogramme obtenu pour le peptide NVTVQELDLQAR

Figure 20 : Chromatogramme obtenu pour le peptide YNLYNSDVFDGK

Figure 21 : Schéma analytique appliqué à l'échantillon de fromage modèle

Figure 22 : Démarche intégrée utilisée pour caractériser les toxi-infections alimentaires collectives à staphylocoques

Liste des abréviations

2D-	:	two dimension-
ADN	:	acide désoxyribonucléique
AESA	:	Autorité européenne de sécurité des aliments
AFSSA	:	Agence française de sécurité sanitaire des aliments
AFSSAPS	:	Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé
AOAC	:	Association of official agricultural chemists
<i>agr</i>	:	accessory gene regulator
AQUA	:	Absolute quantification
ARN	:	acide ribonucléique
<i>A_w</i>	:	activité de l'eau
BHI	:	brain heart infusion
BP	:	Baird Parker
°C	:	degré Celcius
CAT	:	Caractérisation des toxines
CDC	:	Center of disease control
CE	:	Commission européenne
CEA	:	Commissariat à l'énergie atomique
CEB	:	Caractérisation et épidémiologie bactérienne
CLHP	:	Chromatographie liquide haute performance
CPA	:	cellule présentatrice de l'antigène
CMH	:	complexe majeur d'histocompatibilité
Da	:	Daltons
DDASS	:	Direction départementale des affaires sanitaires et sociales
DDSV	:	Direction départementale des services vétérinaires
DGAL	:	Direction générale de l'alimentation
DG SANCO	:	Direction générale de la santé et de la protection des consommateurs
EC	:	électrophorèse capillaire
EDyP	:	Etude dynamique des protéomes
<i>egc</i>	:	enterotoxin gene cluster
EIA	:	enzyme immunoassay
ELFA	:	enzyme linked fluorescent assay

ELISA	:	enzyme linked immunosorbent assay
ES	:	entérotoxine staphylococcique
ESI	:	Electrospray ionisation
ET	:	exfoliatin toxin
FAME	:	fatty acid modifying enzyme
HMPA	:	Hygiène et microbiologie des produits alimentaires
IEF	:	Iso électrofocalisation
INRA	:	Institut national de recherche agronomique
InVS	:	Institut national de veille sanitaire
ISO	:	International standard organisation
LCR	:	laboratoire communautaire de référence
LERQAP	:	Laboratoire d'études et de recherches sur la qualité des aliments et des procédés agro-alimentaires
LNR	:	laboratoire national de référence
MALDI	:	matrix assisted laser desorption ionisation
MSCRAMM	:	microbial surface component recognizing adhesine matrix molecules
NPP	:	nombre le plus probable
PAGE	:	polyacrylamide gel electrophoresis
pb	:	paire de bases
PCR	:	polymerase chain reaction
PFGE	:	pulse field gel electrophoresis
PSAQ	:	protein standard absolute quantification
QconCAT	:	concatemers of standard peptides for absolute quantification
RIA	:	radio immunoassay
RPF	:	rabbit plasma fibrinogen
RPLA	:	reverse passive latex agglutination
<i>S. aureus</i>	:	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>sar</i>	:	staphylococcal accessory regulator
SCP	:	staphylocoque à coagulase positive
SCN	:	staphylocoque à coagulase négative
SDS	:	sodium dodecylsulfate
<i>se</i>	:	staphylococcal enterotoxin (gène)
SE	:	staphylococcal enterotoxin (protéine)
SEI	:	staphylococcal enterotoxin like (protéine)

SERAM	:	secretable expanded repertoire adhesive molecules
SSSS	:	staphylococcal scalded skin syndrome
TCR	:	T cell receptor
TIAC	:	toxi-infection alimentaire collective
ToF	:	time of flight
TSA	:	trypton soy agar
TSST-1	:	toxic shock syndrom toxin 1
UBLO	:	unité des bactéries lactiques et opportunistes
ufc	:	unité formant colonie

Résumé

Les toxi-infections alimentaires collectives staphylococciques représentent ces dernières années en France la seconde cause de toxi-infections alimentaires bactériennes. Ces dernières sont dues à l'ingestion de toxines préformées dans les aliments : les entérotoxines. Actuellement, une vingtaine d'entérotoxines (SEA à SEIV) ont été décrites dans la littérature ; parmi celles-ci, toutes possèdent une activité superantigéniques mais seules quelques unes possèdent une activité émétique prouvée et présentent donc un risque sanitaire pour le consommateur. Deux problèmes majeurs se posent pour confirmer le diagnostic des épisodes toxiques à staphylocoques. D'une part, les staphylocoques sont sensibles aux traitements thermiques appliqués aux aliments alors que les entérotoxines ne le sont pas, et d'autre part les méthodes de détection des entérotoxines staphylococciques actuellement disponibles ne couvrent pas l'ensemble des entérotoxines décrites à ce jour. Ainsi, et afin de proposer une alternative innovante aux tests immuno-enzymatiques utilisés pour la recherche des entérotoxines staphylococciques dans les matrices alimentaires, nous avons mis en place une démarche intégrée « du gène à la protéine » utilisant des outils de biologie moléculaire, d'immunochimie et de physico-chimie des protéines pour caractériser, comprendre et élucider les toxi-infections alimentaires collectives à staphylocoques.

Mots clés : toxi-infections alimentaires collectives, staphylocoques à coagulase positive, entérotoxines, spectrométrie de masse quantitative.

Summary

Staphylococcal food poisoning is one of the most common food-borne diseases resulting from the ingestion of staphylococcal enterotoxins (SEs) preformed in food by enterotoxigenic strains of coagulase-positive staphylococci, mainly *Staphylococcus aureus*. To date, more than twenty SEs have been described: SEA to SEIV. Each of them share superantigenic activity whereas only few of them have been proved to be emetic and thus represent a potential hazard for consumers. Characterisation of staphylococcal food poisoning outbreaks are dependent of various parameters such as isolation of coagulase positive staphylococci and detection of staphylococcal enterotoxins. However, various drawbacks such as heat treatment sensitivity of staphylococci or availability of antibodies against all staphylococcal enterotoxins lead to false diagnosis or to a lack of characterisation of food poisoning outbreaks. Thus, in order to characterise and elucidate staphylococcal food poisoning, we developed an integrated approach from gene to protein using the combination of PCR-based tools, ELISA tests and quantitative MS.

Keywords : staphylococcal food poisoning, coagulase positive staphylococci, staphylococcal enterotoxins, quantitative mass spectrometry.

Préambule

Staphylococcus aureus dispose de nombreux facteurs de virulence pour infecter son hôte. Pour chacune des étapes clés conduisant à l'infection (colonisation, invasion, pénétration et diffusion dans les tissus), *S. aureus* a développé des systèmes permettant d'échapper à la réponse immunitaire de l'hôte. Parmi ces facteurs, certains sont responsables d'infections communautaires et nosocomiales mais aussi de la survenue de toxi-infections alimentaires souvent spectaculaires compte tenu du nombre de personnes exposées et de la violence de la symptomatologie associée. Les travaux de cette thèse portent sur ce deuxième risque engendré par *S. aureus* au travers de la caractérisation et de l'élucidation des intoxications dues à l'ingestion des entérotoxines staphylococciques.

Comme nous le verrons, les entérotoxines staphylococciques sont des exoprotéines à action superantigénique et/ou émétique, produites par certaines souches toxigènes de staphylocoques à coagulase positive. En France, sur la période 1996-2007, ces entérotoxines représentaient la deuxième cause de foyers de toxi-infections alimentaires collectives d'origine bactérienne.

Actuellement, l'investigation des épisodes toxiques repose d'une part sur le dénombrement des staphylocoques à coagulase positive dans les matrices alimentaires suspectées et, d'autre part sur la mise en évidence de certains types d'entérotoxines staphylococciques.

Deux problématiques étaient alors à considérer, la première sur la pertinence de l'isolement des staphylocoques, la seconde relative aux outils disponibles pour la détection des entérotoxines staphylococciques. Cette investigation en deux temps ne nous permettait pas de caractériser correctement les toxi-infections alimentaires collectives car elle présentait d'évidentes lacunes : en effet, dans le cas d'un aliment traité thermiquement, le dénombrement des staphylocoques à coagulase positive ne s'avérait que peu ou pas informatif compte tenu du caractère thermosensible de la bactérie. Dans ce cas, la caractérisation de l'épisode toxique ne reposait que sur la détection des entérotoxines staphylococciques de type SEA à SEE. Or, avec la description des nouvelles formes d'entérotoxines staphylococciques autres que SEA à SEE dont certaines avec activité émétique prouvée (SEG, SEH, SEI ...), il semblait difficile de caractériser et d'élucider de nombreux épisodes à symptomatologie staphylococcique. Pour pouvoir réellement caractériser un épisode toxique il nous a paru alors nécessaire d'étudier la corrélation entre les différentes méthodes d'analyse mises en œuvre pour obtenir des informations de natures différentes et complémentaires sur la présence des staphylocoques, leur pouvoir toxigène, la production de toxines ... Cependant, là encore cette démarche présentait des limites. A titre d'exemple, nous pouvons citer la toxi-infection alimentaire collective survenue en août 2005 dans un restaurant à Ishakawa (Japon). L'enquête épidémiologique démontra que 10 personnes furent atteintes entre deux et 12 heures (délai moyen 7 heures) après

consommation de poissons crus (sashimi), de crabe bouilli et de radis macérés. Les patients furent atteints de vomissements (100 %) de douleurs abdominales (40%) et de diarrhées (30%). Les analyses microbiologiques réalisées sur les restes alimentaires, le personnel des cuisines et les réfrigérateurs démontrèrent que les staphylocoques à coagulase positive étaient présents en faibles nombres (100 unités formant colonie/g pour le crabe et 50 unités formant colonie/g pour le poisson cru et les radis, respectivement). Le pulsotypage par macrodigestion avec l'enzyme *SmaI* effectué sur les différentes souches de staphylocoques à coagulase positive isolées montra que toutes les souches étaient identiques et suggéra que la même souche était responsable de la toxi-infection alimentaire collective. Les vomissures furent testées positives aux entérotoxines staphylococciques sans que les entérotoxines de type SEA à SED n'aient pu être mises en évidence. Enfin, le génotypage de souches de staphylocoques à coagulase positive réalisé par PCR multiplexe pour les gènes *sea* à *see* et *seg* à *selr* s'est avéré négatif (Kuramoto et al., 2006).

Cet exemple illustre clairement les difficultés auxquelles les autorités de contrôle étaient confrontées pour caractériser les épisodes toxiques à staphylocoques.

Suite à la mise en évidence du caractère émétique de l'entérotoxine staphylococcique de type SEH au travers de trois épisodes toxiques où elle était impliquée seule ou en association avec d'autres types toxiques, des anticorps anti SEH ont été développés et utilisés (Peireira et al., 1996, Ikeda et al., 2005, Jorgensen et al., 2005) pour caractériser ces épisodes toxiques. Cependant, compte tenu du coût élevé du développement d'anticorps spécifiques anti entérotoxines, des homologies de séquences entre les entérotoxines et des problèmes de spécificité des outils immunochimiques, il ne semblait pas judicieux de suivre cette voie pour caractériser les entérotoxines nouvellement décrites.

Nous avons donc décidé d'axer les travaux relatifs à l'investigation des épisodes toxiques en utilisant des approches innovantes et complémentaires à la microbiologie conventionnelle et aux outils immunochimiques dans l'objectif non seulement de caractériser mais aussi d'expliquer la survenue des épisodes toxiques.

Nous avons tout d'abord opté pour l'amélioration des outils de détection des entérotoxines staphylococciques pour étendre leur caractérisation.

Nous avons ensuite axé nos travaux sur la caractérisation des souches isolées d'épisodes toxiques tant au niveau des gènes présents qu'au niveau des toxines produites en surnageants de culture et en matrices alimentaires.

Par la suite, nous avons développé une méthode de confirmation innovante, la spectrométrie de masse quantitative, pour quantifier les entérotoxines staphylococciques dans des solutions de référence puis

dans des matrices alimentaires modèles afin de disposer d'une méthode de confirmation de principe différent de l'ELISA.

Enfin, nous avons mis en œuvre l'ensemble de la démarche analytique intégrée du gène à la protéine pour investiguer un cas de TIAC. Ces travaux ont été réalisés en collaboration avec l'unité Caractérisation et épidémiologie bactérienne (CEB) du laboratoire d'études et de recherches sur la qualité des aliments et des procédés agro-alimentaires (LERQAP) et avec le laboratoire d'étude dynamique des protéomes (EdyP) du Commissariat à l'énergie atomique (CEA) de Grenoble.

Introduction

1. Staphylocoques et toxines

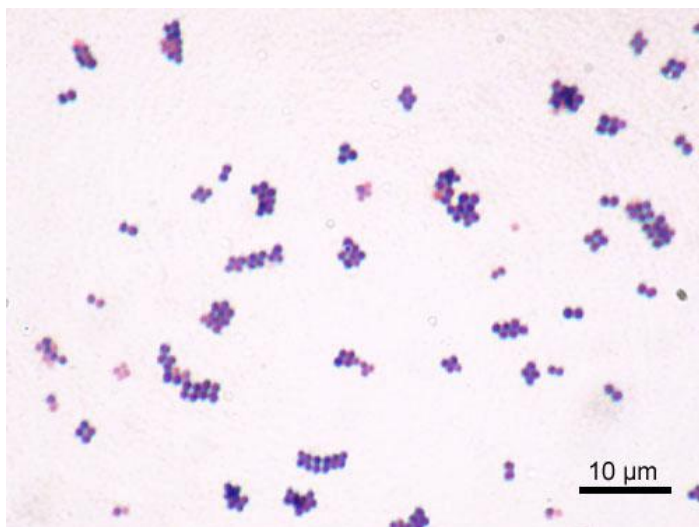
1.1 Staphylocoques

Les premières descriptions des staphylocoques (bactéries en forme de coques) isolés à partir de pus d'abcès datent de 1871 mais ce n'est que quelques années plus tard que ces travaux permettront de proposer un nom à la bactérie rencontrée. Ainsi en 1878, Robert Koch en Allemagne et Louis Pasteur en 1880 en France décrivent des grappes de coques dans du pus d'origine humaine. La même année, en Ecosse, Alexander Ogston propose le nom "Staphylococcus" (staphylê : grappe et kokkos : grain) car les bactéries se regroupent en amas irréguliers ressemblant à une grappe de raisin. Ogston différencie ainsi *Staphylococcus* de *Streptococcus*. Enfin, en 1884, en Allemagne, Anton Julius Friedrich Rosenbach donne la première description du genre *Staphylococcus* en cultivant les bactéries sur milieu solide. Il différencie ainsi *S. aureus* de *S. albus* par la coloration des pigments produits par les colonies.

1.1.1 Taxonomie

Le genre *Staphylococcus* appartient au phylum des Firmicutes (bactéries à Gram positif, figure 1), à la classe des Bacilli et à l'ordre des Bacillales. Outre les *Staphylococcus* sp., la famille bactérienne des *Staphylococcaceae* comprend quatre autres genres moins connus, *Gemella*, *Jeotgalicoccus*, *Macrococcus* et *Salinicoccus*.

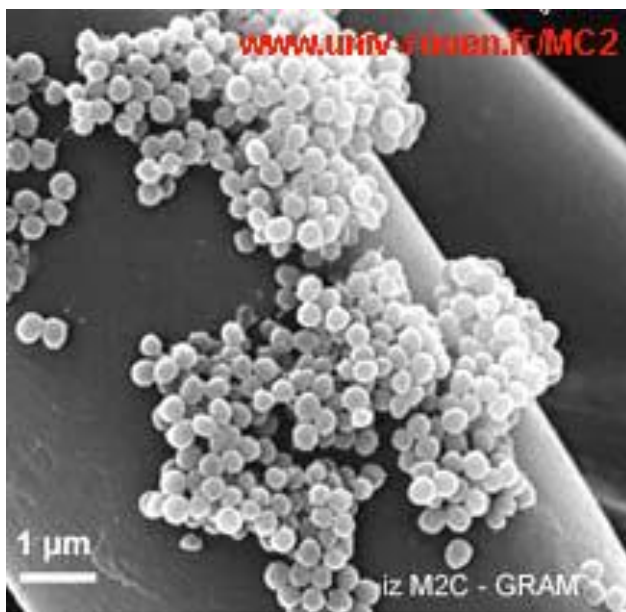
Figure 1 : Aspect de *S. aureus* suite à une coloration de Gram



Le genre *Staphylococcus* présente des cellules immobiles sphériques de 0,5 à 2,5 μm de diamètre, isolées par paires ou en amas (Figure 2). Ces coques à Gram positif possèdent des caractéristiques physiologiques communes ; ils sont chimio-organotrophes, aérobies ou anaérobies facultatifs et possèdent une catalase.

A ce jour, cinquante espèces et sous-espèces ont été identifiées au sein du genre *Staphylococcus*. Les espèces sont généralement classées en deux groupes sur la base de leur capacité à produire une coagulase libre : les staphylocoques à coagulase positive (SCP), généralement considérés comme les plus pathogènes et les staphylocoques à coagulase négative (SCN).

Figure 2 : Aspect de *S. aureus* en microscopie électronique



1.1.2 Réservoirs

Les staphylocoques sont des bactéries ubiquitaires présentes sur la peau, les muqueuses et la sphère rhino-pharyngée chez les animaux à sang chaud (mammifères, volailles) et en particulier chez l'Homme. Les staphylocoques ont également été isolés de l'environnement naturel (sol, eau douce et eau de mer, poussière, air), de l'environnement domestique de l'Homme (cuisine, réfrigérateur), de l'environnement hospitalier et des ateliers de préparation alimentaires et à partir de denrées alimentaires (Tableau 1). La peau et les muqueuses de l'Homme et des animaux constituant l'habitat primaire de *S. aureus*, la présence de ce germe dans l'environnement est vraisemblablement due à une contamination par l'Homme ou les animaux (Bergdoll, 1979).

Tableau 1 : Espèces et sous-espèces du genre *Staphylococcus* et hôtes associés (Stepan et al., 2004)

Espèce	Coagulase	Hôte ou source
<i>S. arletti</i>	-	Caprin, volaille
<i>S. aureus</i> subsp. <i>anaerobius</i> <i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	+	<i>Ovin</i> Homme, animaux, environnement
<i>S. auricularis</i>	-	Homme
<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	-	Homme
<i>S. capitis</i> subsp. <i>ureolyticus</i>	-	Homme, primates
<i>S. caprae</i>	-	Homme, caprins
<i>S. carnosus</i> subsp. <i>carnosus</i>	-	Produits carnés
<i>S. carnosus</i> subsp. <i>utilis</i>	-	Aliments
<i>S. chromogenes</i>	-	Animaux, lait
<i>S. cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i>	-	Homme
<i>S. cohnii</i> subsp. <i>urealyticum</i>	-	Homme, animaux
<i>S. condimentii</i>	-	Sauce au soja
<i>S. delphini</i>	+	Dauphins
<i>S. epidermidis</i>	-	Homme, animaux, environnement
<i>S. equorum</i> subsp. <i>equorum</i>	-	Chevaux, bétail
<i>S. equorum</i> subsp. <i>linens</i>	-	Surface fromage affiné
<i>S. felis</i>	-	chats
<i>S. fleurettii</i>	-	Fromage lait de chèvre
<i>S. gallinarum</i>	-	Volailles, oiseaux
<i>S. haemolyticus</i>	-	Homme, animaux domestique, environnement
<i>S. hominis</i> subsp. <i>hominis</i>	-	Homme
<i>S. hominis</i> subsp. <i>novobiosepticus</i>	-	Homme
<i>S. hyicus</i>	+/-	Animaux, aliments
<i>S. intermedius</i>	+	Mammifère, oiseaux, rarement Homme
<i>S. kloosii</i>	-	Animaux sauvages
<i>S. lentus</i>	-	Animaux, rarement Homme
<i>S. lugdunensis</i>	-	Homme
<i>S. lutrae</i>	+	Loutre
<i>S. muscae</i>	-	Mouches, porcs
<i>S. nepalensis</i>	-	chèvre
<i>S. pasteurii</i>	-	Homme, animaux, aliments
<i>S. pettenkoferi</i>	-	Homme
<i>S. piscifermentans</i>	-	Poisson fermenté
<i>S. pseudintermedius</i> (Devriese et al., 2005)	+	Animaux
<i>S. saccharolyticus</i>	-	Homme
<i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>bovis</i>	-	Animaux
<i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i>	-	Homme, animaux
<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>coagulans</i>	+	Chiens
<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>schleiferi</i>	-	Homme
<i>S. sciuri</i> subsp. <i>carnaticus</i>	-	Produits carnés
<i>S. sciuri</i> subsp. <i>lentus</i>	-	Animaux
<i>S. sciuri</i> subsp. <i>rodentium</i>	-	Rongeurs, animaux
<i>S. sciuri</i> subsp. <i>sciuri</i>	-	Homme, animaux
<i>S. simiae</i> (Pantucek et al., 2005)	-	Singe
<i>S. simulans</i>	-	Homme, mammifère
<i>S. succinus</i> subsp. <i>casei</i>	-	Surface de fromage affiné
<i>S. succinus</i> subsp. <i>succinus</i>	-	ambre

<i>S. vitulinus</i> (anciennement <i>S. pulvereri</i>)	-	Animaux, aliments
<i>S. warneri</i>	-	Homme, primates
<i>S. xylosus</i>	-	Homme, animaux, environnement

En rouge : espèces de Staphylocoques impliquées dans des toxi-infections alimentaires collectives

1.1.3 *Staphylococcus aureus*

S. aureus représente l'espèce la plus largement incriminée dans les toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) ; elle appartient au groupe des staphylocoques à coagulase positive.

Deux sous espèces ont été décrites au sein de l'espèce *S. aureus* : *S. aureus subsp. aureus* (Rosenbach, 1884) et *S. aureus subsp. anaerobius* (De la Fuente et al., 1985). Cette sous espèce a été isolée d'abcès chez le mouton et possède des caractéristiques particulières (croissance en anaérobiose, catalase négative). Cette sous espèce est très marginale, la quasi totalité des souches de *S. aureus* appartiennent à la sous espèce *aureus*.

Les principales caractéristiques de *S. aureus* sont résumées ci-après: *S. aureus* est une bactérie aéro-anaérobie facultative, thermosensible, qui requiert des températures de croissance comprises entre 6 et 46°C (avec optimum à 37°C). C'est une bactérie neutrophile (croissance entre pH 4 et 9,8) qui survit dans les aliments déshydratés et/ou congelés et qui tolère pour sa croissance une concentration en sels (NaCl) élevée (jusqu'à 20%) et une activité de l'eau a_w réduite (0,83). *S. aureus* étant une bactérie exigeante en acides aminés et en vitamines, sa croissance peut être inhibée par la présence de flores de compétition présentes dans les aliments. Son rôle pathogène en toxi infection alimentaire collective (TIAC) est lié à la sécrétion de protéines douées de propriétés neurotoxiques chez l'Homme et qu'on appelle entérotoxines staphylococciques.

1.2 Entérotoxines staphylococciques

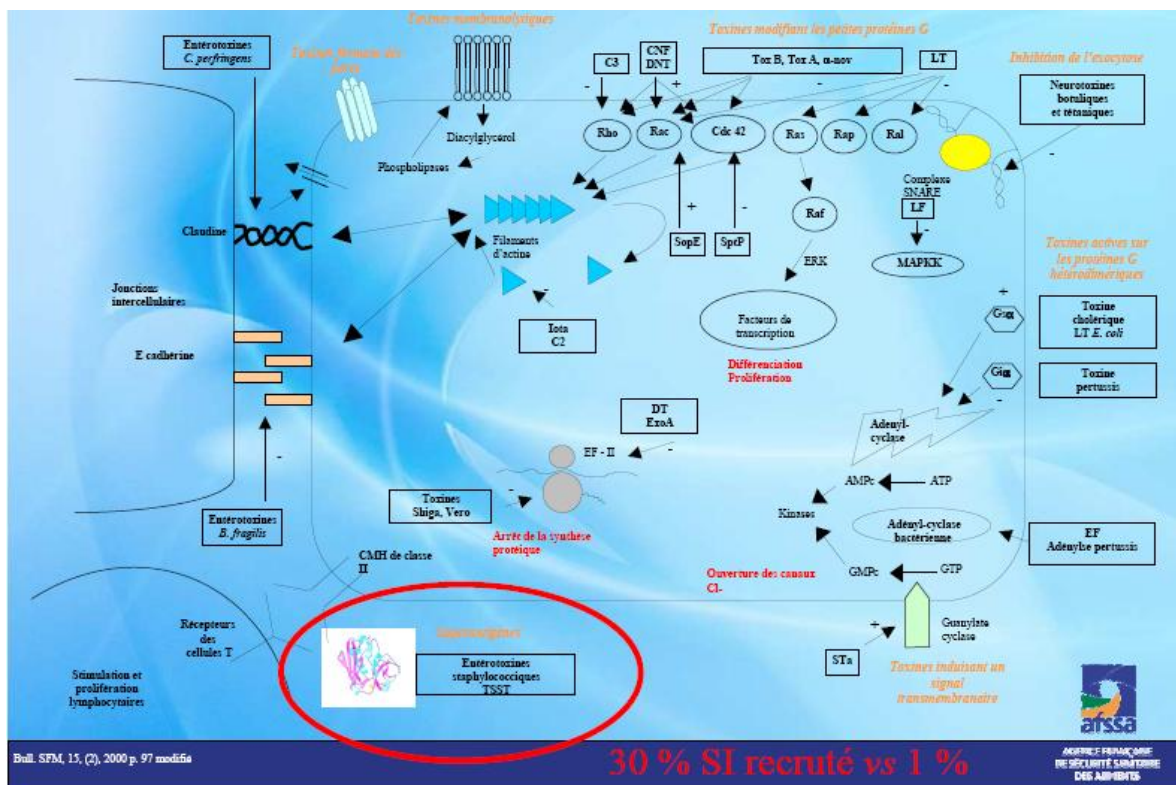
Les entérotoxines staphylococciques (ES) constituent un groupe de molécules hautement toxiques produits par les staphylocoques dans les aliments. Ce sont des exoprotéines de masse moléculaire compris entre 22 et 29 kDa. Leur première description remonte à 1959 (Bergdoll et al.). Elles appartiennent à la famille des exoprotéines pyrogéniques produites par certaines souches de staphylocoques à coagulase positive et par quelques espèces de streptocoques.

Cette famille de protéines présente des propriétés biologiques communes : pyrogénicité (élévation de la température corporelle) et activation des lymphocytes T (action superantigénique). La figure 3 représente le mode d'interaction entre différentes toxines bactériennes et les cellules eucaryotes : les

entérotoxines activent la réponse immunitaire en recrutant 30 % du système immunitaire (versus 1 % pour un antigène classique) d'où leur appellation de superantigènes.

Parmi les staphylocoques à coagulase positive, plusieurs espèces peuvent sécréter des ES, c'est le cas de *Staphylococcus aureus* (espèce majoritairement retrouvée dans les épisodes toxiques) et de *Staphylococcus intermedius* dont une souche fut impliquée dans un cas d'intoxication alimentaire aux Etats-Unis (Becker et al., 2001 ; Khambarty et al., 1994). D'après certains auteurs, quelques espèces à coagulase négative comme *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus xylosus* et *Staphylococcus haemolyticus* peuvent également produire des ES (Bautista et al., 1988 ; Cunha et al, 2007 ; Veras et al., 2008 ; Zell et al., 2008) mais ceci n'a pour l'instant pas été confirmé par les études réalisées en France.

Figure 3 : Représentation schématique des interactions entre toxines bactériennes et cellules eucaryotes



1.2.1 Nomenclature et propriétés

Les études sur les ES (SE en nomenclature internationale anglo-saxonne pour Staphylococcal Enterotoxin) ont débuté suite à la mise en évidence de *S. aureus* dans des aliments incriminés lors de toxi-infections alimentaires. A ce jour, 23 ES différentes (SEA – SEIV) ont été identifiées (Tableau 2).

Les toxines de types SEA, SEB, SEC, SED et SEE représentent les ES dites « classiques » car bien caractérisées et identifiées depuis de nombreuses années et dont l'implication dans des cas d'intoxications alimentaires a été démontrée par de nombreux auteurs (Jones et Kahn, 1986 ; Betley et Mekalanos, 1988 ; Couch et al., 1988 ; Bayles et landolo, 1989 ; Dingues et al., 2000). Pour ces toxines, la séquence peptidique a été élucidée avant de connaître la séquence nucléotidique. Ce fut le cas notamment pour la toxine de type A - SEA (Huang et al., 1987), B - SEB (Huang et Bergdoll, 1970) et C - SEC (Schmidt et Spero, 1983). Le sérotype C (Figure 4) est subdivisé en groupes (SEC1, SEC2, SEC3, SEC_{bovine}, SEC_{ovine}, SEC_{caprine} et SEC_{canine}) classés sur la base de différences d'activité superantigénique et en fonction de l'hôte auquel elles sont associées (Bergdoll et al., 1965 ; Marr et al., 1993). L'entérotoxine staphylococcique SEF a été décrite en 1981 (Bergdoll, 1981) mais a été renommée quelques années plus tard TSST1 compte tenu de son manque d'activité émétique contrairement aux autres entérotoxines staphylococciques classiques (Blomster-Hautamaa et al., 1986). Les données très récemment obtenues depuis le milieu des années 1990, à partir de l'analyse du génome de *S. aureus* ont pu mettre en évidence de nombreux gènes présentant de fortes homologues de séquence avec les gènes des ES dites « classiques ». Ces gènes produisent des protéines aux propriétés structurales proches des ES dont l'activité émétique n'a que rarement été démontrée car toutes n'ont pas été produites en système *in vitro*.

En 2004, une nouvelle nomenclature concernant les superantigènes exprimés par *S. aureus* a été proposée pour la désignation de ces nouvelles ES (Lina et al., 2004). En conséquence, seules les toxines induisant une activité émétique après administration par voie orale chez l'animal ont été désignées « ES ». Les autres toxines, pour lesquelles aucune activité émétique n'a été démontrée, ont été appelées « staphylococcal enterotoxin-like (SEI) » pour indiquer que leur rôle dans des intoxications alimentaires n'a pas été confirmé. Ces nouveaux types d'ES ont donc été désignés SEIJ à SEIR et SEIU puisque, à l'exception de SEH, SEI et SEG, aucune de ces toxines ne présentait d'activité émétique *in vivo* (Ren et al., 1994 ; Jarraud et al., 2001 ; Orwin et al., 2001 ; Letertre et al., 2003a ; Omoe et al., 2003 ; Su et Wong 1996 ; Munson et al., 1998). Cependant, très récemment, Ono et al. (2008) ont identifié au niveau génétique, cloné puis purifié deux nouvelles entérotoxines staphylococciques SES et SET. Ces auteurs ont ainsi pu démontrer leur pouvoir émétique sur l'animal. Lors de cette même étude, le potentiel émétique de la SEIR a été démontré, permettant ainsi de la renommer en SER. A notre connaissance, l'implication de ces entérotoxines nouvellement décrites (SEA à SEIV) dans les TIAC reste à démontrer.

Enfin, toutes ces toxines partagent des similarités d'homologie de séquence en acides aminés allant de 15,5% (entre SEB et SEK) à 81% (entre SEA et SEE) ce qui, nous le verrons ultérieurement peut engendrer des manques de spécificité des outils utilisés pour leur détection.

Figure 4 : structure tridimensionnelle de l'entérotoxine de type SEC d'après Chi et al. (2002)



Les entérotoxines staphylococciques sont riches en lysine, acide aspartique, acide glutamique et tyrosine. La plupart possèdent un pont disulfure nécessaire à leur conformation et probablement impliqué dans l'activité émétique (cf ci-dessous). Elles sont très stables, résistantes à la plupart des enzymes protéolytiques telles que la pepsine ou la trypsine et gardent ainsi leur activité après ingestion d'aliments contaminés, dans le tube digestif. Elles résistent aussi à la chymotrypsine, la rénine et la papaïne. Néanmoins, SEB et SEC1 ont pu être hydrolysées en peptides par une digestion trypsique modérée au niveau du pont disulfure. SEB peut être détruite par la pepsine à pH 2 mais est résistante à la pepsine à des pH supérieurs, qui sont les conditions généralement rencontrées dans l'estomac après l'ingestion de nourriture (Bergdoll, 1983). Les ES sont également très thermorésistantes (Tableau 3). Elles sont réputées plus thermorésistantes dans les aliments qu'en milieu de culture, en condition de laboratoire mais elles peuvent être inactivées par les traitements thermiques utilisés en appertisation lorsqu'elles sont présentes en faible concentration (Bergdoll, 1983). Les traitements thermiques en milieu acide aboutissent généralement à une perte d'activité immunologique par dégradation des acides aminés et à la perte concomitante d'activité biologique. Cependant, il a été montré que SEA et SED peuvent être indétectables (perte de reconnaissance sérologique) mais rester actives, c'est-à-dire toxiques, (sur des tests *in vivo* sur le chat) après traitement thermique (Bennett, 1995). L'inactivation thermique de SEA, SEB et SEC est variable selon la matrice alimentaire et le pH (Schwabe et al., 1990). Il est ainsi difficile de prévoir l'impact de traitement thermique sur l'activité des ES, puisque celle-ci dépend du type d'ES, de leur concentration et de la matrice alimentaire. En effet, les ES étant des protéines, il est admis que ces dernières forment des liaisons faibles avec les composés de la matrice alimentaire aboutissant ainsi à un effet protecteur. De plus, dans certains cas, l'inactivation thermique est spontanément réversible, en pH alcalin (Schwabe et al., 1990) ou par un traitement à l'urée (Akhtar et al., 1996). Dans l'ensemble, ces données montrent que les ES résistent à des conditions (traitement thermique, pH acide) qui détruisent facilement *S. aureus* lui-même. Ainsi, dans le cas des aliments ayant subi un traitement thermique, seule la détection des ES pourra permettre *in fine* de caractériser l'épisode toxique. Il est donc important de disposer de méthodes de détection pour ce type de toxines.

Tableau 2 : Caractéristiques majeures des entérotoxines staphylococciques

ES	Longueur phase codante (paire de bases)	Taille ES (acidé aminé)	Masse moléculaire (kDa)	pHi	Référence
A	774	233	27,100	7,3	Betley et Mekalanos, 1985 ; 1988
B	801	239	28,336	8,6	Shafer et landolo, 1979. Jones et Khan, 1988
C1	801	239	27,531	8,6	Bohach et Sclievert, 1987.
C2	801	239	27,531	7,8	Bohach et Sclievert, 1989.
C3	801	239	27,563	8,1	Hovde et al., 1990.
C (bovine)			27,618	7,6	Marr et al., 1993.
C (ovine)			27,517	7,6	Marr et al., 1993.
C (caprine)			27,600	7,0	Marr et al., 1993.
D	777	228	26,360	7,4	Chang et Bergdoll, 1979. Bayles et landolo, 1989.
E	774	230	26,425	7,0	Couch et al., 1988.
G	777	233	27,043	5,7	Munson et al., 1998.
H	726	218	25,210	5,65	Su et Wong, 1995 ; Ren et al., 1994
I	729	218	24,928	8,37	Munson et al., 1998.
J	806	245*	28,565*	8,65*	Zhang et al., 1998.
K	729	219	25,539	6,5	Orwin et al., 2001
L	723**	215*	24,593*	8,66*	Fitzgerald et al., 2001
M	722**	217*	24,842*	6,24*	Jarraud et al., 2001
N***	720**	227*	26,067*	6,97*	Jarraud et al., 2001
O***	783**	232*	26,777*	6,55*	Jarraud et al., 2001
P	783	232*	26,608	6,19*	Kuroda et al., 2001
Q	729	216	25,076	6,60	Diep et al., 2006
R	780	233	27,049	8,76	Omoe et al., 2004
S		257	26,217		Ono et al., 2008
T		216	22,614		Ono et al., 2008
U	783	232	27,192	6,20	Letertre et al., 2003a
U2	771	227	26,672	7,20	Thomas et al., 2006
V	720	217	24,997	6,07	Thomas et al., 2006

* : Masse moléculaire et point isoélectrique de la partie mature déterminés par les auteurs à l'aide du logiciel MWCALC

** : longueur de la partie mature déterminée par les auteurs d'après Nielsen et al., 1997

*** : nommées SEK and SEL dans Jarraud et al. 2001, renommées SEN et SEO respectivement dans un note correctrice publiée dans J. Immunol. 2001. 166:4260.

Tableau 3 : Résistance de *S. aureus* et des entérotoxines au traitement thermique

Résistance de <i>S. aureus</i> au traitement thermique	Durée (min)
D * 50,0°C (en milieu tampon phosphate 0,1 M)	de 9,5 à 42,2 en fonction des souches testées
D 55,0°C (en milieu tampon phosphate 0,1 M)	3
D 62,8°C (en milieu chlorure de sodium)	0,4 – 1,1
Résistance des entérotoxines au traitement thermique	Durée (min)
D 100°C (en milieu lait)	70
D 110°C (en milieu lait)	26
D 120°C (en milieu lait)	9,4

* D (temps de réduction décimale d'un micro-organisme ou d'une toxine exprimé en minutes) : durée nécessaire à la température T pour détruire 90% des germes ou des toxines initialement présents

1.2.2 Déterminisme génétique et régulation

Les gènes spécifiant les ES ont des supports génétiques divers dont la caractéristique commune est d'appartenir à un élément génétique mobile (Tableau 4). Ils peuvent être portés par des plasmides (*seb*, *sed*, *sej*, *ser*, *ses*, *set*) (Shalita et al., 1977 ; Bayles et landolo, 1989 ; Zhang et al., 1998 ; Omoe et al., 2002 ; Ono et al., 2008), par des phages (tempéré pour *sea* ou défectif pour *see*) (Betley et Mekalanos, 1985 ; Coleman et al. 1989 ; Couch et al., 1988), par des îlots génomiques (*seb*, *sec*, *seg*, *seh*, *sei*, *sek*, *sel*, *sem*, *sen*, *seo*, *sep* et *seq*). Le gène *sec* peut également se trouver sur un plasmide ou un îlot de pathogénicité selon la provenance de l'isolat (Fitzgerald et al., 2001). Jarraud et al. (2001) ont mis en évidence l'existence d'un opéron, *egc* (enterotoxin gene cluster), codant pour plusieurs ES : SEG, SEI, SEM, SEN et SEO. Cet *egc* est également constitué de deux pseudogènes (*Ψent1* and -2). Ce locus joue probablement un rôle de réservoir pour les gènes de ES, des phénomènes de duplication et de recombinaison à partir d'un même gène ancestral peuvent en effet être à l'origine de nouvelles toxines. Ceci a été démontré par l'identification et l'analyse des gènes *seu*, *seu2* et *sev* (Letertre et al., 2003a ; Thomas et al., 2006). La localisation de ces gènes sur des éléments génétiques mobiles peut entraîner un transfert génétique horizontal entre les souches de *S. aureus*. Par exemple, le gène *seb* est situé sur le chromosome chez certaines isolats cliniques (Shafer et landolo, 1978) alors qu'il a été localisé sur un plasmide chez d'autres souches de *S. aureus* (Shalita et al., 1977).

Tableau 4 : Support génétique des gènes d'entérotoxines staphylococciques

Gène	Localisation génétique	Référence
<i>sea</i>	Prophage	Betley et Mekalanos, 1985 ; Borst et Betley, 1994
<i>seb</i>	chromosome plasmide, transposon	Shafer et landolo, 1978 Shalita et al., 1977; Altboum et al., 1985
<i>sec1</i>	plasmide	Altboum et al., 1985
<i>sec_{bov}</i>	llet de pathogénicité	Fitzgerald et al., 2001.
<i>sed</i>	Plasmide (pIB485)	Bayles et landolo, 1989
<i>see</i>	Phage défectif	Couch et al., 1988
<i>seg</i>	<i>Enterotoxin gene cluster (egc)</i> , chromosome	Jarraud et al., 2001
<i>seh</i>	élément génétique mobile putatif	Noto et Archer, 2006
<i>sei</i>	<i>egc</i> , chromosome	Jarraud et al., 2001
<i>sej</i>	Plasmide (pIB485)	Zhang et al., 1998
<i>sek</i>	llet de pathogénicité	Orwin et al., 2001
<i>sel</i>	llet de pathogénicité	Fitzgerald et al., 2001.
<i>sem</i>	<i>egc</i> , chromosome	Jarraud et al., 2001
<i>sen</i>	<i>egc</i> , chromosome	Jarraud et al., 2001
<i>seo</i>	<i>egc</i> , chromosome	Jarraud et al., 2001
<i>sep</i>	prophage (Sa3n)	Omoe et al., 2005
<i>seq</i>	îlot de pathogénicité	Jarraud et al, 2002
<i>ser</i>	Plasmide (pIB485)	Omoe et al., 2003
<i>ses</i>	Plasmide (pIB485)	Ono et al, 2008
<i>set</i>	Plasmide (pIB485)	Ono et al, 2008
<i>seu</i>	<i>egc</i> , (fusion entre <i>ent1</i> et <i>ent2</i>), chromosome	Letertre et al, 2003a
<i>seu2</i>	<i>egc</i> , (délétion partielle dans les pseudogènes <i>øent1</i> et <i>øent2</i>), chromosome	Thomas et al., 2006
<i>sev</i>	<i>egc</i> , (recombinaison entre <i>selm</i> et <i>sei</i>), chromosome	Thomas et al., 2006

Le principal système régulateur contrôlant l'expression des facteurs de virulence chez *S. aureus* est le système *agr* (accessory gene regulator; Kornblum et al., 1990). Ce système agit en combinaison avec le système *sar* (staphylococcal accessory regulator; Cheung et al., 1992 ; Novick, 2001). L'expression de certaines ES, mais pas toutes, est contrôlée par le système *agr*. L'expression des gènes *seb*, *sec* et *sed* a été démontrée dépendante du système *agr* alors que l'expression de *sea* et *sej* est indépendante (Tremaine et al., 1993 ; Zhang et al., 1998). Les travaux de Vojtov et al. (2002) ont démontré que SEB, comme TSST-1, est un régulateur global négatif de l'expression de gènes d'exoprotéines et qu'il agit via

le système *agr*. L'expression d'*agr* est étroitement liée au quorum sensing (Novick, 2001). La production des ES dépendantes d'*agr* dans les aliments est par conséquent dépendante de la capacité de *S. aureus* à croître jusqu'à une densité cellulaire élevée (estimée à 10^6 ufc/g) dans les aliments et les facteurs environnementaux, très mal connus, semblent jouer un rôle important dans l'expression des gènes des ES.

Afin de comprendre ces mécanismes de régulation, il convenait alors de s'intéresser aux facteurs externes (température, pH, activité de l'eau, présence de flore annexe ...) régissant l'expression des ARNm et la production de toxines pour les gènes codants pour les ES dépendants ou non du système *agr*. Ainsi, différents auteurs se sont penchés sur différents facteurs régulant l'expression des gènes de croissance de *S. aureus* (Alomar et al., 2008 ; Charlier et al., 2008 ; Bore et al, 2007 ; Anderson et al., 2006) mais peu de données sont disponibles sur l'impact de ces facteurs sur la production d'entérotoxines. A notre connaissance, seuls Delbes et al. (2006) ont travaillé sur l'impact pour la production d'ES de ces différents facteurs externes. Il en ressort que pour une technologie fromagère donnée (fromage de type salers à pâte pressée non cuite), le nombre de SCP doit atteindre 10^5 ufc/g et le pH doit être supérieur à 6 en début de fabrication pour que des entérotoxines staphylococciques puissent être détectées.

1.2.3 Modes d'action

Les ES appartiennent à une famille de toxines pyrogènes présentes chez les staphylocoques et les streptocoques. Ces toxines pyrogènes comprennent les ES, la toxine du syndrome de choc toxique (TSST), les exfoliatines A et B et les toxines pyrogènes streptococciques. Ces toxines partagent des similitudes de structure (à l'exception des exfoliatines A et B), fonction et séquence. Elles ont aussi une parenté phylogénétique (Balaban et Rasooly, 2000). Jusqu'à récemment, les ES ont été mises en évidence en étudiant les souches de *S. aureus* impliquées dans des TIAC staphylococciques, et elles étaient classées en types sérologiques distincts. Ainsi, l'activité émétique plus ou moins puissante de SEA à E et SEH a été clairement démontrée. Plus récemment, l'accroissement des données résultant de l'analyse des séquences partielles ou complètes a permis l'identification de plusieurs nouveaux types de ES (SEIJ à SEIV). Ces nouvelles ES ont d'abord été identifiées sur la base de similarités de séquence et de structure avec les ES existantes. Lorsqu'elles ont été menées, les expériences ont démontré leur activité superantigénique *in vitro* et/ou *in vivo* mais plus rarement leur activité émétique (Tableau 5). Bien que les toxines pyrogéniques soient impliquées dans diverses pathologies, elles possèdent des activités biologiques communes: elles sont pyrogènes et provoquent une immunosuppression et une prolifération non-spécifiques de lymphocytes T. Ces activités définissent

l'activité superantigénique. A côté de ces caractéristiques communes, certaines toxines sont capables de causer d'autres symptômes. Parmi les superantigènes, seules les ES ont une activité émétique. Les activités superantigéniques et émétiques correspondent à deux fonctions séparées localisées sur deux domaines de la protéines (Dinges et al., 2000 ; Hovde et al., 1994). Néanmoins, il existe une forte corrélation entre ces activités puisque, dans la plupart des cas, des mutations génétiques aboutissant à une perte d'activité superantigénique aboutissent aussi à la perte d'activité émétique.

Tableau 5 : Activités superantigénique et émétique des entérotoxines staphylococciques

Type de toxine	Liaison aux chaînes α et β du CMH II *	Pouvoir émétique **
SEA	+ / +	+
SEB	+ / -	+
SEC1	+ / -	+
SEC2	+ / -	+
SEC3	+ / -	+
SED	+ / +	+
SEE	+ / +	+
SEG	+ / -	+
SEH	- / +	+
SEI	Non réalisé / +	+
SEIJ	Non réalisé / +	Non réalisé
SEK	Non réalisé / +	Non réalisé
SEIL	Non réalisé / +	-
SEIM	Non réalisé / +	Non réalisé
SEIN	Non réalisé	Non réalisé
SEIO	Non réalisé	Non réalisé
SEIP	Non réalisé	Non réalisé
SEIQ	Non réalisé	-
SER	?	+
SES	Non réalisé / +	+
SET	Non réalisé / +	+
SEIU	Non réalisé	Non réalisé
SEIU2	Non réalisé	Non réalisé
SEIV	Non réalisé	Non réalisé

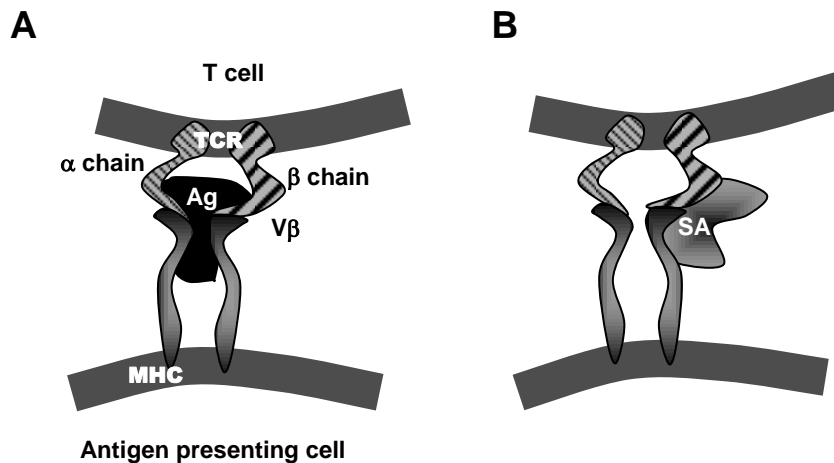
* : fixation (+) ou non fixation (-) ; ** : activité émétique démontrée (+) ou non démontrée (-)

1.2.3.1 L'activité superantigénique

L'activité superantigénique résulte de l'interaction directe des ES avec les cellules T réceptrices d'antigène (TCR pour T-Cell antigen Receptor) et le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) des cellules présentatrices d'antigène (CPA). Un antigène normal est présenté au TCR sous la forme de peptides liés au CMH de classe I ou II après leur digestion et présentation par les CPA (Figure 5A). Les CMH sont des complexes protéiques exposés à la surface des CPA. Le TCR est un hétérodimère glycosylé composé de chaînes variables $V\alpha$ et β , δ et γ . Cette reconnaissance de l'antigène est une étape préliminaire dans la réponse immunitaire cellulaire et est une des clés de la spécificité de la réponse immunitaire. Seules quelques cellules T peuvent reconnaître un antigène spécifique présenté par les CMH d'une CPA (Mac Cormick et al., 2001). A l'exception de SEH (spécifique des chaînes $V\alpha$ des TCR), les toxines superantigéniques interagissent avec de nombreuses cellules T par reconnaissance des chaînes $V\beta$ spécifiques des TCR. Elles sont capables d'associer les TCR et le CMH de classe II des CPA, causant ainsi l'activation non spécifique des cellules T (Figure 5B). Il semble qu'une interaction entre les ES et le CMH soit d'abord requise pour la liaison à la chaîne $V\beta$ des CPA. Cette liaison entraîne l'activation non-spécifique et la prolifération des cellules T ainsi qu'une sécrétion massive d'interleukines qui semble être impliquée dans le mécanisme de la toxicité des ES. A travers cette interaction, le nombre des cellules T activées est plusieurs milliers de fois supérieur au nombre des cellules T activées par un antigène dit classique d'où la dénomination de superantigène. Cette activation massive cause le syndrome de choc toxique, pouvant être fatal, du à la TSST-1 (Mac Cormick et al., 2001). De nombreuses études génétiques et cristallographiques ont permis de caractériser les domaines des ES impliqués dans ces interactions. SEB a été particulièrement étudiée pour son activité superantigénique puissante. Suite aux études de stabilité et de capacité de dispersion par aérosol entreprises aux Etats-Unis lors du programme militaire biologique achevé en 1969, le sérotype B a été classé par le CDC (Center of Disease Control, Atlanta) comme agent incapacitant utilisable dans un cadre bioterroriste. Les souches productrices de SEB sont de ce fait considérées comme des armes microbiologiques puissantes à des fins militaires ou terroristes (Greenfield et al., 2002). En France, depuis 2001, la détention, la mise en oeuvre et la cession de cette toxine sont soumises à réglementation et à autorisation auprès de l'AFSSAPS (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé).

Outre son implication dans des pathologies graves, l'activité superantigénique est largement (nombreuses ES testées) et finement (aspects mécanistiques et quantitatifs) caractérisée car il est possible de l'étudier *in vitro*, sur des suspensions de lymphocytes T.

Figure 5 : Activation spécifique et non-spécifique des lymphocytes T d'après Balaban et Rasooly (2000)



- A. Activation des lymphocytes T par un antigène conventionnel. Après avoir été digéré par la cellule présentatrice d'antigène, le peptide antigénique (Ag) est présenté dans le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de Classe II. Ce complexe attire les lymphocytes T portant des récepteurs à lymphocyte T (TCR) ayant une chaîne variable Vβ spécifique de l'Ag présenté.
- B. Activation non spécifique de lymphocytes T par le superantigène. Le superantigène se lie directement à l'extérieur du CMH de classe II et le relie à la chaîne Vβ (dans la majorité des cas). Cet événement initie l'activation non-spécifique des lymphocytes T.

1.2.3.2 L'activité émétique

L'activité émétique des ES n'est pas aussi bien caractérisée que l'activité superantigénique. L'activité entérotoxine au sens strict repose uniquement sur la capacité des ES à provoquer une réponse émétique lorsqu'elles sont administrées oralement alors que les autres superantigènes ne sont pas émétiques (Dinges et al., 2000). Le mode d'action des ES pour causer les TIAC est peu documenté. Ceci rend de fait difficile tout développement de mesure protectrice et de médicaments antitoxines d'autant plus que l'apparition des symptômes est généralement très rapide. L'absence de modèle animal capable de reproduire les manifestations cliniques de la toxi-infection staphylococcique est probablement l'un des facteurs limitant les avancées. Les modèles animaux classiques comme la souris, le rat ou le lapin ne présentent en effet aucun réflex émétique en réponse à l'ingestion de ES. D'autres modèles animaux, comme le chien, sont quant à eux trop sensibles pour que leur utilisation soit pertinente. Chez le chaton, l'administration intraveineuse de SEB (Bergdoll, 1988) peut induire le

reflex émétique mais curieusement, une ingestion intragastrique ne le fait pas (Sugiyama et al., 1966). Ce modèle animal a ainsi été écarté compte tenu du peu de spécificité de la réponse émétique provoquée par l'administration d'ES. Il serait plus approprié d'utiliser des singes (rhésus ou cynopithèque) qui présentent les symptômes émétiques reproduisant ceux de l'Homme après administration orale, gastrique, intraveineuse ou péritonéale (Sugiyama et al., 1961 ; Sugiyama et Hayama, 1964). Naturellement, ces études sur les primates sont très restreintes pour des raisons de coût et d'éthique. D'autres études ont montré qu'une dose de 30 µg de SEH provoquait des effets émétiques lors d'administration orale chez le singe (Su et Wong, 1995).

Bien que beaucoup de données soient disponibles sur les relations structure-fonction en jeu dans l'activité superantigénique, l'activité émétique n'est, quant à elle, pas précisément localisée. L'une des caractéristiques communes à toutes les ES est la présence d'un pont disulfure, supposé important pour l'activité émétique d'après des études de mutagenèse dirigée (Dinges et al., 2000 ; Hovde et al., 1994). Cependant, SEI n'a pas de pont disulfure et est cependant douée, à la fois, d'activité superantigénique et émétique. L'activité émétique de SEI étant néanmoins significativement moins forte que celle des autres ES (Munson et al., 1998), la question du rôle du pont disulfure reste en suspens.

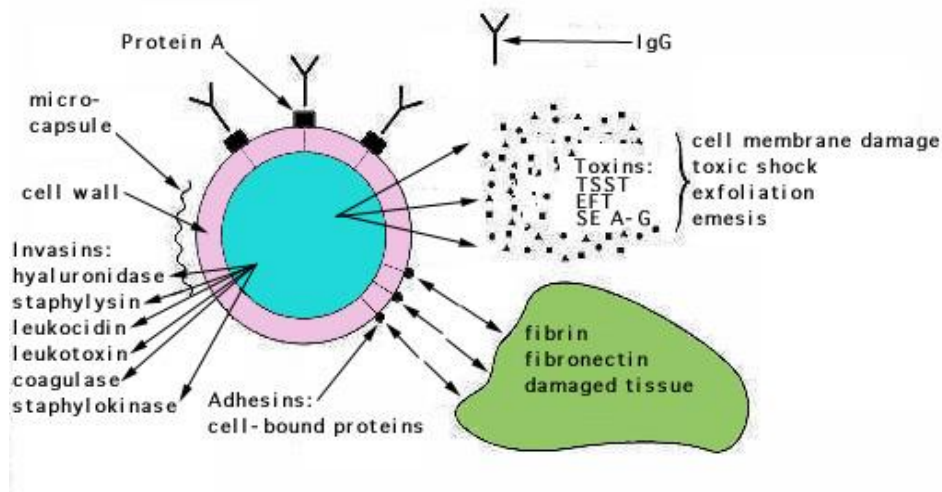
De plus, l'analyse des séquences de deux autres ES, SE/K et SE/L, a révélé l'absence de pont disulfure (Orwin et al., 2001 ; Fitzgerald et al., 2001). L'activité émétique de SE/K n'a pas encore été testée. SE/L, quant à elle, ne possède pas d'activité émétique (Orwin et al., 2003).

Certaines études suggèrent que les ES agissent directement sur l'épithélium intestinal et sur le nerf vague provoquant une stimulation des centres émétiques et du transit intestinal (Arbuthnott et al., 1990 ; Bergdoll, 1983). Afin d'étudier le pouvoir émétique de certaines entérotoxines, plusieurs auteurs (Hu et al., 1999 ; 2003 ; 2007 ; Wright et al., 2000 ; Ono et al., 2008) se sont penchées sur les mécanismes d'action déclenchant les vomissements. Plusieurs modèles animaux (singe cynomologus, furet et musaraigne) ont été utilisés pour réaliser les expérimentations par injections intrapéritonéales et/ou par ingestion orale d'entérotoxine staphylococcique de type SEA. Hu et al. (2007) ont ainsi pu démontrer que la SEA induisait la libération de sérotonine (5-hydroxytryptamine 5-HT) dans l'intestin suite à une injection intrapéritonéale. La sérotonine se fixe alors sur les récepteurs de type 5-HT₃ présents sur le nerf vague conduisant à une activation des centres émétiques. Lors d'expérimentations de dénervation, ces auteurs ont démontré que la SEA n'induisait plus de vomissement. Enfin, l'utilisation d'analogues de la 5-HT comme les carboanilés de type 1 inhibe la réponse émétique.

1.3 Autres facteurs de virulence de *Staphylococcus aureus*

S. aureus est responsable d'une grande variété d'infections. Pour coloniser et infecter son hôte, *S. aureus* a développé, en plus des entérotoxines staphylococciques, de nombreux facteurs de virulence lui permettant de résister aux systèmes de défense. Ces facteurs de virulence (protéines de surface, exotoxines et enzymes extra-cellulaires) sont impliqués dans les différentes étapes nécessaires à l'infection par le staphylocoque (colonisation par adhésion, invasion par échappement aux défenses de l'hôte, infection par pénétration et diffusion dans les tissus) dans l'objectif d'inhiber à chacune de ces étapes la réponse immunitaire de l'hôte. L'expression de ces différents facteurs est temporellement régulée au cours de la croissance bactérienne *in vitro* et au cours de l'infection (Wright et al., 2003). Cette régulation est sous la dépendance de nombreux systèmes de régulation dont le régulateur global dénommé Agr «*accessory gene regulator*» déjà mentionné pour les ES. L'effecteur de ce système est un ARN nommé ARNIII. Cet ARN régulateur réprime l'expression des facteurs d'adhésion et des protéines associées à la paroi en phase exponentielle de croissance et contrôle positivement l'expression des exoprotéines en phase post-exponentielle de croissance (exoenzymes et toxines). La pathogénie de *S. aureus* implique principalement trois classes de facteurs de virulence : les protéines sécrétées (superantigènes, cytotoxines, enzymes extra-cellulaires), les protéines de surface présentées page suivante, qui sont des protéines fixant le fibrinogène, la fibronectine, le collagène, d'autres adhésines, et les composants de la paroi (capsule, composants du peptidoglycane). Ces facteurs de virulence sont, soit codés par le chromosome et présents chez presque toutes les souches, soit codés par des éléments génétiques mobiles comme les transposons, les plasmides ou les phages. Les principaux facteurs sont présentés figure 6.

Figure 6 : Facteurs de virulence de *S. aureus*



L'adhésion est la première étape de l'infection staphylococcique. Cette étape de liaison entre les composés bactériens de surface et les composés membranaires des cellules hôtes empêche l'élimination de *S. aureus* par les phénomènes mécaniques. Cette étape fait intervenir les protéines de surface appartenant au groupe des MSCRAMM (microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules), des SERAM (secretable expanded repertoire adhesive molecules) et la coagulase.

La survie de *S. aureus* lors d'une l'infection est intimement liée à sa capacité de leurrer le système immunitaire de l'hôte infecté. Ainsi, *S. aureus* a développé de nombreuses stratégies de défense grâce à la composition de sa paroi (peptidoglycane, protéine A), à la synthèse d'enzyme extracellulaires (lipases, protéase V8, staphylokinase) et à la libération de toxines (leucocidines, toxines à activité superantigénique décrites précédemment).

Enfin, afin d'assurer sa diffusion et sa propagation au sein des tissus de l'hôte infecté, *S. aureus* s'est doté de nombreux facteurs de virulence. Parmi ceux ci, sont retrouvées des enzymes (hyaluronidase, hyaluronate lyase, phospholipase C), des toxines formant des pores (toxines α , β et δ) et des toxines désorganisant les jonctions intercellulaires (exfoliatines ETA, ETB, ETC et ETD).

Il est important de noter que ces facteurs n'ont pas de rôle avéré dans le déclenchement des toxi-infections alimentaires à staphylocoques.

2. Toxi-infections alimentaires collectives à staphylocoques à coagulase positive

2.1 Définition

Une toxi-infection alimentaire collective (TIAC) est définie par l'incidence de deux cas ou plus, d'une maladie similaire, à symptomatologie gastro-intestinale le plus souvent, dont la cause peut être rapportée à une même origine alimentaire (Delmas et al., 2006).

Les TIAC à staphylocoques sont dues à l'ingestion d'entérotoxines staphylococciques, toxines protéiques préformées dans les aliments par des souches entérotoxigènes de staphylocoques à coagulase positive. L'espèce incriminée est principalement *S. aureus*. L'aliment ne devient toxique que si des conditions favorables à une multiplication bactérienne importante et à la toxinogénèse se trouvent réunies.

Ainsi le diagnostic d'une TIAC à staphylocoques se trouve confirmé lorsqu'au moins un des paramètres énoncés ci-dessous est vérifié :

- dénombrement de *S. aureus* dans l'aliment suspecté supérieur à 10^5 unités formant colonie (ufc)/g,
- détection des entérotoxines staphylococciques dans la matrice alimentaire
- isolement à partir des fécès des malades et de la matrice alimentaire d'une souche de *S. aureus* de même lysotype (Bryan et al., 1997).

2.2 Historique

En Belgique en 1894, J. Denys rapporte que la consommation d'une viande partiellement cuite de vache malade a été responsable d'une toxé infection alimentaire familiale où un décès est survenu.

Aux Philippines, Barber (1914) a décrit un épisode toxique dû aux staphylocoques. Il a découvert que l'ingestion de lait provenant d'une vache atteinte de mammite pouvait provoquer l'apparition d'une symptomatologie de type gastro-intestinal lorsque celui-ci était laissé à température ambiante et que ceci était dû à la présence d'une substance toxique produite par des staphylocoques dans le lait.

Baerthlein rapporte en 1922 un épisode toxique survenu au printemps 1918 lors du siège de Verdun.

Bien que cet épisode toxique ait été en premier lieu attribué à la présence de bacilles de l'espèce *Proteus vulgaris*, il semblerait qu'après analyse bactériologique mettant en évidence des microcoques et description des symptômes, cet épisode soit dû à des entérotoxines staphylococciques.

« Je vais [vous] rapporter le cas d'une manifestation étendue d'empoisonnement de saucisses (approximativement 2000 cas) qui a eu lieu au printemps de 1918 pendant le siège de Verdun et qui aurait probablement pu avoir des conséquences militaires catastrophiques. Aux premiers jours de juin 1918 des soudaines et massives manifestations ayant l'aspect d'une gastro-entérite aiguë qui, dans quelques cas graves, ont fait croire à du choléra, ont touché la troupe entourant Verdun; les compagnies entières étaient handicapées excepté juste quelques personnes, et, dans les deux jours environ 2000 hommes avaient été atteints. Les symptômes étaient si graves qu'une partie des troupes (plus de 200 personnes malades) a dû être transférée dans les hôpitaux de campagne. Le soupçon de l'intoxication alimentaire a été évoquée car, selon les rapports des personnes malades, la maladie est survenue en 2 ou 3 heures (avec une plus petite partie entre 6 et 8 heures) après l'ingestion d'un plat de saucisses. Seules les personnes parmi les troupes n'ayant pas participé au repas ont été épargnées : [à savoir] soldats de la compagnie qui ont dû retourner aux sièges sociaux pour recevoir des commandes ; soldats qui pour d'autres raisons n'avaient pas mangé les saucisses, soldats qui étaient en permission et/ou ayant eu un régime différent. Cependant, il était surprenant que parmi les troupes

non présentes sur le front, c'est à dire les bouchers, qui avaient mangé des mêmes saucisses deux jours plus tôt, on n'ait observé aucun cas de maladie ».

Plus tard, Dack et al. (1930) ont mis en évidence que l'ingestion d'un gâteau avait provoqué une symptomatologie de type gastro-intestinal chez onze personnes. Ces auteurs ont associé l'épisode toxique avec la présence d'une exotoxine produite par une souche de staphylocoque doré à caractère hémolytique. Afin de confirmer leur hypothèse, ils ont produit des surnageants de culture de cette souche qu'ils ont ensuite administrés par voie intraveineuse à un lapin et par voie orale à trois volontaires humains. Le lapin a présenté une diarrhée aqueuse létale, tandis que les trois volontaires humains ont éprouvé, trois heures après ingestion, des nausées, des frissons et des vomissements. Il ressortait donc de ces premières descriptions, une maladie à symptomatologie d'apparition rapide.

Bien que la période d'incubation et la sévérité des symptômes observés dépendent de la concentration d'entérotoxines ingérées et de la sensibilité de chaque individu (Harvey et Gilmour, 2000), les premiers symptômes, nausées suivies de vomissement caractéristiques incoercibles, apparaissent dans les 30 minutes à huit heures (trois heures en moyenne) après ingestion de l'aliment contaminé.

Parmi les autres symptômes fréquemment décrits lors d'épisodes toxiques à staphylocoques, il est fait mention de douleurs abdominales, de diarrhées, vertiges et faiblesse générale parfois accompagnée d'une fièvre modérée. Lors des cas les plus sévères, des maux de tête, une prostration et une hypotension ont été rapportés. Dans la majorité des cas, les symptômes régressent spontanément sans avoir recours à un traitement spécifique dans les 18 à 24 heures, les diarrhées et la faiblesse générale ressentie pouvant durer 24 heures de plus (Bergdoll, 1979).

Bien que la symptomatologie associée soit bénigne, une hospitalisation peut s'avérer nécessaire pour les cas les plus graves. La déshydratation brutale due aux vomissements et aux diarrhées peut provoquer un état de choc. La mortalité reste exceptionnelle, touchant les individus les plus sensibles à la déshydratation (nourrissons et personnes âgées) et les personnes atteintes d'une pathologie sous-jacente.

2.3 Déclaration des épisodes toxiques

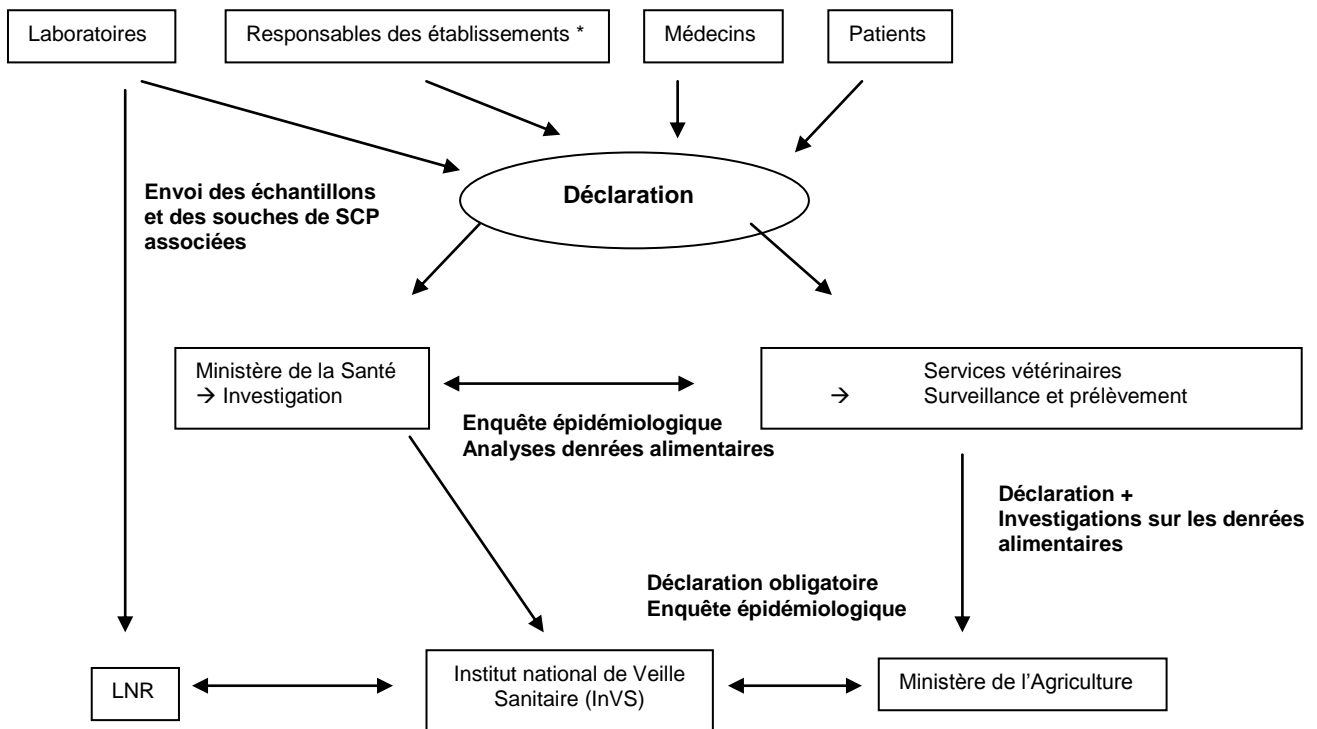
En France (Figure 7), les TIAC figurent sur la liste des trente maladies à déclaration obligatoire (DO) auprès des inspecteurs de santé publique vétérinaire (DDSV) ou des inspecteurs de santé publique des services d'affaires sanitaires et sociales (DDASS). Cette déclaration permet ainsi de diligenter une enquête épidémiologique afin d'identifier le (ou les) aliment(s) responsable(s) et de prendre des mesures correctives (modifications de préparations, réduction de la contamination des matières premières...) afin que l'incident ne se reproduise pas.

Les foyers peuvent être classés en trois catégories :

- confirmés : lorsque l'agent est isolé dans un prélèvement clinique (sang/selles) ou dans des restes alimentaires ;
- suspectés : lorsque l'agent pathogène n'a pas été mis en évidence ; il est alors suspecté à l'aide d'un algorithme d'orientation étiologique prenant en compte les signes cliniques, la durée médiane d'incubation et le type d'aliments consommés ;
- d'étiologie inconnue lorsque l'agent pathogène n'a été ni confirmé ni suspecté à l'aide de l'algorithme.

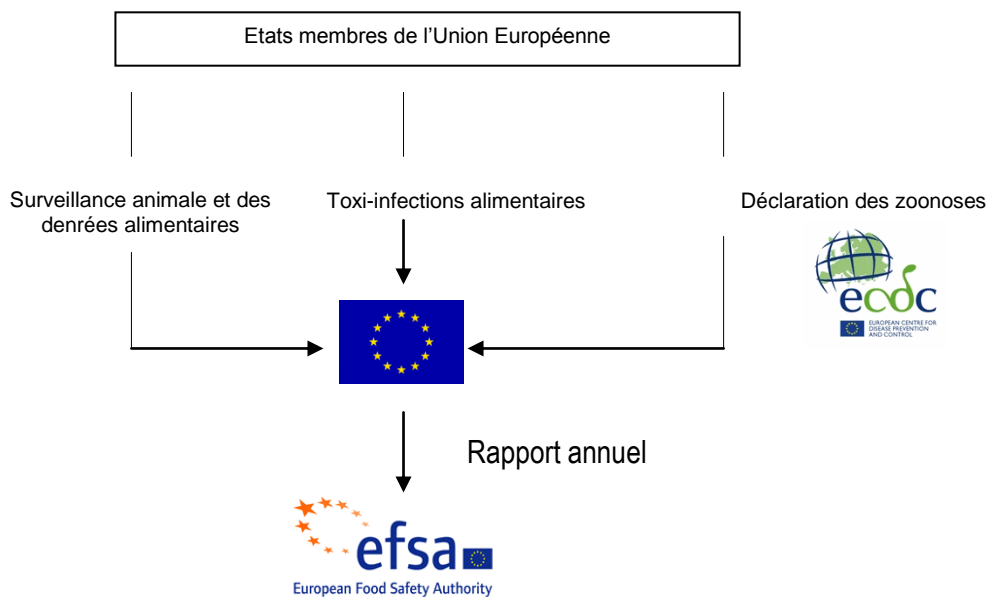
Au niveau européen, le système de communication sur les foyers de toxi-infection alimentaire est fondé sur la directive 2003/99/CE relative à la surveillance des zoonoses et des agents zoonotiques (Anonyme, 2003d). La déclaration des TIAC n'étant obligatoire que depuis 2005, avant cette période, elle ne s'effectuait que sur la base du volontariat ou au travers du système d'alerte rapide mise en place par la Commission Européenne pour avertir les différents Etats Membres des contaminants rencontrés dans les aliments en libre circulation. Le système de déclaration repose sur une interface informatique où chaque rapporteur national entre dans une base de données les informations relatives aux épisodes toxiques. Les données recueillies sont ensuite conservées par l'Autorité européenne de sécurité des aliments (AESAs) puis analysées par le centre de collaborations sur les zoonoses qui prépare un compte rendu analytique. Ce compte rendu est ensuite validé par les Etats Membres puis publié sous forme de rapport annuel par l'AESA (Figure 8).

Figure 7 : Système de déclaration des toxi-infections alimentaires collectives au niveau français



* : ou chef de famille

Figure 8 : Système de déclaration des toxi-infections alimentaires collectives au niveau européen



2.4 Incidence

Bien que les TIAC soient des maladies à déclaration obligatoire, l'incidence réelle des TIAC à staphylocoques reste difficile à évaluer avec précision. En effet, la maladie étant d'apparition rapide avec rétablissement en un à deux jours, la consultation médicale (et *a fortiori* la déclaration) ne s'impose pas dans la majorité des cas. Ainsi, il est à supposer qu'un grand nombre de foyers familiaux ne sont pas déclarés aux autorités sanitaires. Cependant, de nombreux auteurs considèrent que les TIAC à staphylocoques sont une des causes majeures de maladies d'origine alimentaire au niveau mondial (Balaban et Rasooly, 2000 ; Bergdoll, 1979; Jablonski et Bohach, 2001 ; Mead et al., 1999; Minor et Marth, 1971 ; Mossel et al., 1995 ; Omoe et al., 2002 ; Shimizu et al., 2000).

2.4.1 En France

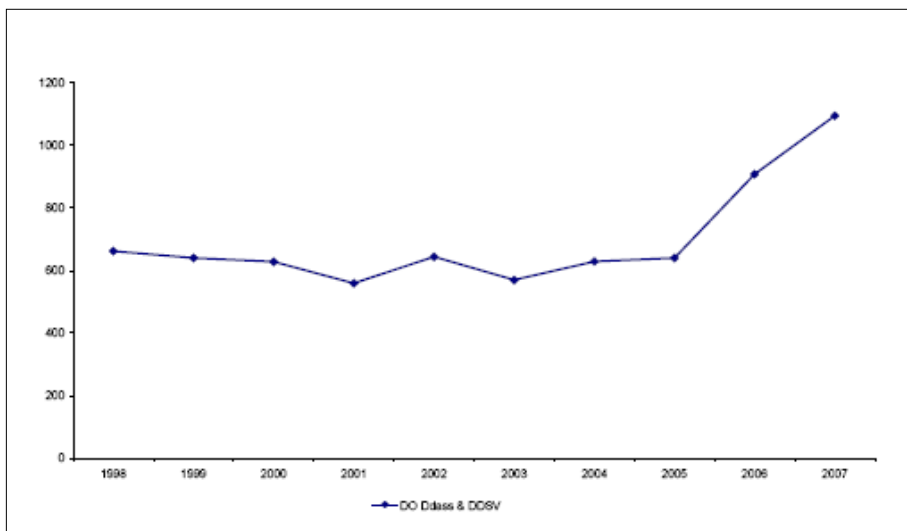
L'Institut de Veille Sanitaire (InVS) recense tous les ans le nombre de foyers de TIAC déclarés. Sur la période 1996-2006 (Figure 9), 6755 foyers de TIAC ont été déclarés dont 1281 (19,0 %) pour lesquels *S. aureus* aurait joué un rôle (Delmas et al., 2006 ; Jourdan Da Silva et Vaillant, 2008). Ainsi les staphylocoques représentaient, sur cette période, la deuxième cause de TIAC en France derrière les salmonelles. Ces données montrent également que les staphylocoques représentent la première cause de TIAC impliquant le lait et les produits laitiers : en effet, *S. aureus* a été responsable de 205 (69,7 %) des 294 foyers impliquant cette catégorie d'aliments. Sur les 1271 foyers rapportés, *S. aureus* a été l'agent confirmé dans 411 foyers correspondant à 6051 cas, 1245 hospitalisations et 3 décès et il a été suspecté dans 870 foyers correspondant à 9807 cas et 898 hospitalisations et 1 décès.

De même sur la période 1996-2007, 7850 foyers de TIAC ont été déclarés dont 1458 (18,6 %) pour lesquels *S. aureus* aurait joué un rôle. Ainsi, comme sur la période 1996-2006, *S. aureus* représente la deuxième cause de TIAC en France derrière les salmonelles.

Pour l'année 2006, l'InVS a rapporté que *S. aureus* aurait joué un rôle dans 18,8 % des foyers. Ce pathogène a été confirmé dans 45 foyers (301 cas, 63 hospitalisations, 1 décès) et suspecté dans 126 foyers (881 cas, 86 hospitalisations, 1 décès). Ainsi, *S. aureus* occupait le premier rang des agents bactériens responsables de TIAC pour son implication en nombre de foyers. Pour l'année 2007, l'InVS a rapporté que *S. aureus* aurait joué un rôle dans 16,2 % des foyers. Ce pathogène a été confirmé dans 40 foyers (396 cas, 80 hospitalisations, 2 décès) et suspecté dans 137 foyers (1408 cas, 86 hospitalisations). Ainsi, comme en 2006, *S. aureus* occupe le premier rang des agents bactériens responsables de TIAC pour son implication en nombre de foyers. Sur les 177 foyers déclarés en 2007, 65 % des TIAC staphylococciques sont survenues en restauration collective et 30,5 % sont survenues

en foyers familiaux. Les TIAC survenues en restauration collective ont été à l'origine de 63,3 % des malades. Cette différence de pourcentages montre une prédominance de la restauration collective dans le nombre de foyers et par voie de conséquence dans le nombre de personnes malades. Cette inégalité peut en partie s'expliquer par une très bonne déclaration des cas survenus en restauration collective. Ceci est d'autant plus vrai qu'avec un temps d'incubation très court, les personnes sont souvent encore ensemble lors de l'apparition des premiers symptômes. Au contraire, le nombre de foyers familiaux doit être sous estimé : en effet, avec une symptomatologie très impressionnante mais avec une récupération rapide dans la majorité des cas, le recours à la consultation d'un médecin ou à une hospitalisation est faible.

Figure 9 : Nombres de foyers de toxi-infections alimentaires collectives à *S. aureus*, période 1996-2007, France d'après Jourdan Da Silva et Vaillant (2008)



2.4.2 En Europe

Les données présentées ci-dessous sont extraites des rapports de l'Autorité européenne de sécurité des aliments (AESa) (Anonyme, 2006c ; 2007b) et regroupent les cas de TIAC déclarés par les différents Etats Membres en 2005 (première année où la déclaration de ces épisodes était obligatoire et harmonisée) et en 2006. Les données pour l'année 2007 présentées ci-dessous n'ont pas été validées. Elles proviennent d'une communication faite par P.A. Beloiel (AESa) lors de la réunion annuelle des Laboratoires Nationaux de Référence qui s'est tenue en juin 2008 à Maisons-Alfort.

En 2005, 23 Etats Membres ont rapporté 5311 foyers touchant 47251 personnes. Ces foyers ont provoqué 5330 hospitalisations et 24 décès ont été recensés. Il est à noter que le nombre de foyers déclarés a diminué de 22 % par rapport à 2004. Comme en 2004, l'agent pathogène le plus souvent

incriminé en 2005 a été *Salmonella* spp. avec 63,6 % des foyers. Le second pathogène le plus souvent incriminé a été *Campylobacter* avec 9,2 % des foyers. Viennent ensuite les virus (6 %) puis les entérotoxines de staphylocoques (3,1 % des foyers).

Les 164 foyers dus à des entérotoxines staphylococciques ont été responsables de 1692 cas dont 21,5 % ont nécessité une hospitalisation. Les aliments responsables ont été le plus souvent des produits carnés mais l'implication d'autres catégories alimentaires telles que les fruits, les légumes, les produits laitiers, les produits de la mer et les ovoproduits a été également rapportée.

En 2006, 22 Etats Membres ont rapporté 5710 foyers touchant 53568 personnes. Ces foyers ont provoqué 5525 hospitalisations et 50 décès ont été recensés. Le nombre total d'épisodes toxiques a donc augmenté de près de 7 % par rapport à l'année 2005. Comme en 2005, l'agent pathogène le plus souvent incriminé en 2006 a été *Salmonella* spp. avec 59,3 % des foyers. Les seconds pathogènes les plus souvent incriminés ont été les virus avec 10,2 % des foyers. Viennent ensuite les *Campylobacter* spp. (6,9 %) puis les entérotoxines de staphylocoques (4,1 % des foyers). Les 243 foyers dus à des entérotoxines staphylococciques ont été responsables de 2369 cas dont 16,0 % ont nécessité une hospitalisation et de deux décès. Dans 125 foyers sur les 243 rapportés (51,4 %) les aliments responsables n'ont pas été identifiés. Les produits laitiers, produits carnés et volailles ont été responsables de 26 (10,7 %), 19 (7,8 %) et 16 foyers (6,6 %) respectivement.

Pour l'année 2007, seuls 10 Etats Membres (correspondant à huit séries de données exploitables) ont notifié des informations relatives à la contamination des denrées alimentaires par *S. aureus* et ses entérotoxines dans un cadre de contrôles officiels au regard des règlements 2073/2005/CE (Anonyme, 2005a) et 1441/2007/CE (Anonyme, 2007c). Sur les 1528 échantillons analysés, 24 (soit 1,6 %) se sont révélés positifs en entérotoxines staphylococciques. Dans 19 cas il s'agissait de fromages, dans 3 cas de produits laitiers, dans un cas d'un lait et dans le dernier cas d'un plat cuisiné. Ce dernier cas, bien documenté, correspondait à un épisode toxique ayant touché 15 personnes (adultes et enfants) et impliquant des hamburgers.

2.4.3 Aux Etats Unis

Aux Etats Unis, certains auteurs (Mead et al., 1999) estiment que les épisodes toxiques dus à *S. aureus* seraient responsables d'environ 185000 cas correspondant à 1750 hospitalisations et à deux décès par an. Cependant, sur la période 1993-1997, le Center for Disease Control (Anonyme, 2000) a rapporté que *S. aureus* n'avait été impliqué que dans 42 foyers de TIAC correspondant à 1413 cas mais avait causé deux décès. Enfin, sur la période 1998-2002, 6647 foyers de maladies d'origine alimentaire ont été notifiés (Anonyme, 2006d). Ces épisodes ont été responsables de 128370 cas. Pour 33 % des

foyers dont l'étiologie a pu être déterminée 55% étaient dus à des bactéries. *S. aureus* était responsable de 1,5 % de ces foyers d'origine bactérienne confirmée, avait atteint 2766 cas et causé deux décès.

2.4.4 Au Japon

Entre 1980 et 1999, un total de 2525 épisodes toxiques à staphylocoques induisant 59964 cas ont été rapportés au Japon (Shimizu et al., 2000).

Au début des années 1980, le nombre de cas annuels étaient compris entre 3000 et 5000 par an pour ensuite chuter à moins de 1000 cas au début des années 1990 (Anonyme, 2001).

Entre 1987 et 1996, 32 foyers correspondant à 2846 cas ont été déclarés impliquant essentiellement des repas pris dans des écoles (Michino et Otsuki, 2000).

Enfin, un épisode toxique de grande ampleur a été rapporté durant l'été 2000 dans la province d'Osaka au Japon. Ce dernier, incriminant des laits écrémés liquides et en poudre a été responsable de plus de 13000 cas (Asao et al., 2003 ; Ikeda et al., 2005).

Au matin du 27 juin 2000, l'entreprise ayant commercialisé les produits suspectés reçut son premier rapport d'incident par l'intermédiaire d'un consommateur dont les enfants avaient été malades après avoir bu du lait écrémé lors du dîner de la veille. Parallèlement les services de la mairie d'Osaka reçurent en provenance des centres hospitaliers des rapports mentionnant un épisode toxique pouvant être relié à la consommation de lait. Forts de leur précédente expérience de 1996 relative à un épisode toxique causé par *E. coli* O-157, ils procédèrent à l'inspection de l'usine d'Osaka dès l'après midi du 28 juin. L'entreprise suspectée décida de ne pas procéder immédiatement à un rappel de lot. Ainsi ce sont plus de 13000 cas qui furent déclarés après consommation de briques de lait écrémé de 1 L et 500 mL ou de lait en poudre. Toutes les tranches d'âge de la population furent touchées (personnes âgées de 10 mois à 94 ans).

L'enquête épidémiologique a permis de faire ressortir les caractéristiques de cet épisode toxique :

- Le produit incriminé était du lait en poudre ajouté à du lait liquide,
- aucun staphylocoque n'a été isolé des produits incriminés,
- des entérotoxines staphylococciques de type SEA (Asao et al., 2003) ont été détectées à des teneurs comprises entre 2,8 à 18,8 ng/g dans les briques de lait écrémé et de 4 ng /g dans la poudre de lait écrémé,
- Ikeda et al (2005) ont plus tard mis en évidence la présence d'entérotoxines de type SEH à des teneurs comparables à la toxine de type SEA

- une des valves de tank de lait n'avait pas été suffisamment nettoyée engendrant ainsi une contamination importante en staphylocoques
- une coupure électrique a eu lieu au cours du procédé de transformation du lait liquide en lait en poudre. Ainsi les staphylocoques se sont développés et ont excrété des entérotoxines staphylococciques. Lors de la remise du courant, la montée en température a détruit les staphylocoques mais n'a pu inactiver les entérotoxines formées.

En plus de l'impact sur la santé publique, les conséquences économiques de cet épisode ont été importantes :

- L'usine incriminée a fermé pendant 15 jours,
- une baisse des ventes de lait de plus de 76 % a été observée le mois suivant,
- les pertes ont été estimées à 6 M€ auxquelles se sont ajoutées l'indemnisation des victimes (soit 110 €/j, remboursement frais médicaux, perte de revenu).
- enfin, cinq centrales de production ont été fermées ce qui a conduit au licenciement de 1700 personnes sur les 7000 que comptait la société.

2.5 Conditions requises pour déclencher une TIAC à staphylocoques

Cinq conditions sont requises pour que survienne une TIAC à staphylocoques :

- une source de staphylocoques producteurs d'entérotoxines,
- un moyen de transmission à l'aliment (matière première contaminée, outil de découpe mal nettoyé...),
- un aliment favorable,
- des conditions environnementales appropriées pendant le temps nécessaire à une multiplication bactérienne importante et à la toxinogénèse,
- une ingestion de toxines en quantité suffisante pour déclencher la maladie.

2.5.1 Source de staphylocoques producteurs d'entérotoxines

La fréquence de production d'entérotoxines dites classiques A à E par les souches de *S. aureus* est très variable en fonction des études publiées, de l'origine, alimentaire ou non, des souches testées, et de leur origine géographique. Il apparaît que cette fréquence varie en réalité en fonction du biotype des souches lorsque celui-ci est recherché. D'après différentes enquêtes, le pourcentage de souches productrices des entérotoxines A à E varie de 30 à 60 % pour les souches d'origine humaine, de 60 à

80 % pour les souches d'origine ovine ou caprine et de 0 à 15 % pour les souches d'origine bovine et aviaires (Bergdoll, 1991 ; Genigeorgis, 1989 ; Rosec et al., 1997).

Une étude effectuée en France (Rosec et al., 1997) sur diverses catégories d'aliments a montré que 30,5 % des 213 souches testées produisaient une des 5 entérotoxines recherchées (A à E) avec des variations importantes en fonction de l'aliment d'origine des souches : 12,5 % pour les souches isolées de fromages au lait cru de vache, 31,5 % pour les souches isolées de plats cuisinés, 62,5 % pour les souches isolées de fromage au lait cru de chèvre et de brebis et 64 % pour les souches isolées de pâtisseries. Dans cette étude, près de 60 % des souches isolées d'aliments et appartenant au biotype humain (donc susceptibles d'avoir une origine humaine) étaient entérotoxigènes. On retrouve bien un pourcentage de souches productrices d'entérotoxines variable en fonction du biotype dominant associé à chacune de ces catégories d'aliment, à savoir le biotype humain dans les produits cuits manipulés (plats cuisinés et pâtisseries) et les biotypes bovin ou ovin dans les fromages au lait cru de vache ou de brebis (De Buyser et Sutra, 2005).

De 70 à 95 % des souches de *S. aureus* isolées d'aliments responsables de TIAC sont entérotoxigènes. La prédominance de l'entérotoxine A est observée dans de nombreux pays. L'entérotoxine E n'est pratiquement jamais détectée (Mac Lauchlin et al., 2000 ; Shimizu et al., 2000). L'absence de production d'entérotoxines par une minorité de souches suspectées d'être à l'origine de TIAC pourrait être due au fait que ces souches produisent des quantités d'entérotoxines trop faibles pour être détectables dans les conditions d'essai utilisées, ou qu'elles produisent des entérotoxines non reconnues par les anticorps utilisés comme outils de détection dans les méthodes d'analyse par immunochimie.

Qu'en est-il des nouvelles entérotoxines, décrites postérieurement aux entérotoxines « classiques » SEA à SEE et non détectables par les méthodes commerciales actuellement disponibles ?

La présence des gènes *seg* à *sej* a été recherchée par amplification génique chez de nombreuses souches de *S. aureus* d'origines diverses. Il apparaît que ces gènes sont fréquemment détectés, en particulier les gènes *seg* et *sei* faisant partie de l'opéron *egc* (enterotoxin gene cluster). Dans certaines enquêtes, la prise en compte de ces gènes augmente considérablement la proportion de souches potentiellement toxigènes. En France, 57 % de 258 souches isolées d'aliment variés étaient porteuses de *seg*, *seh* et *sei* et 31 % portaient uniquement ces gènes (Rosec et Gigaud, 2002). En Irlande, 64 % de 157 souches isolées de réfrigérateurs domestiques étaient porteuses de *seg* et *sei* alors que 7 % seulement étaient porteuses des gènes *sea* à *see* (Smyth et al., 2006). Enfin, parmi les souches impliquées ou suspectées dans des TIA, certaines ne portaient que le gène *seh* ou que les gènes *seg* et *sei*, ou aucun des gènes *sea* à *sei* (Mac Lauchlin et al., 2000). La méthode PCR permet de démontrer l'existence de gènes *se* dans les souches mais elle ne permet pas de déterminer si

l'entérotoxine correspondante est effectivement produite. Omoe et al. (2002) ont pu montrer à l'aide de leurs propres réactifs que les souches porteuses du gène *seh* produisaient des quantités importantes de SEH dans un bouillon de culture, mais que la plupart des souches porteuses des gènes *seg* et *sei* produisaient des quantités très faibles de SEG et SEI.

L'implication de SEH a été démontrée par la mise en évidence de cette entérotoxine dans des aliments responsables de TIAC, une fois seule dans une purée (Jorgensen et al., 2005) et une fois en association avec l'entérotoxine A dans du lait (Ikeda et al., 2005) et de l'entérotoxine D dans du fromage (Pereira et al., 1996).

L'implication des toxines de types SEG et SEI reste quant à elle plus discutable. Seule la mise en évidence de ces toxines dans l'aliment suspect permettra de démontrer leur responsabilité dans une TIA. Enfin, avant 2006, très peu d'études intégraient la recherche des gènes *sek* à *seu* et *a fortiori* la détection des toxines correspondantes. Ainsi, l'incidence de ces toxines n'est pas documentée dans les épisodes toxiques.

2.5.2 Mode de contamination

La présence de *S. aureus* dans les aliments peut avoir deux origines principales:

- dans le cas des denrées crues d'origine animale (viandes, lait), elle peut résulter d'une contamination primaire de l'aliment. Ainsi la contamination du lait cru peut être due à la présence dans un troupeau d'animaux présentant des mammites à *S. aureus* (figure 10). Les carcasses de mammifères ou de volailles peuvent être contaminées au moment de l'abattage des animaux à partir de différentes sources : portage de *S. aureus* au niveau du pelage ou du plumage, de la peau de la mamelle, des narines des animaux, des muqueuses génitales et du tube digestif; infections staphylococciques (infections cutanées, abcès)
- pour tous les aliments, elle peut résulter d'une contamination d'origine humaine lors de la fabrication de l'aliment ou lors de sa préparation domestique. Dans ce cas, les souches de *S. aureus* peuvent provenir d'un portage sain sur la peau et les muqueuses, ou d'infections staphylococciques (plaies infectées, sinusites, angines, rhinopharyngites). La contamination peut se faire soit directement lors de la manipulation de l'aliment, soit par l'intermédiaire d'aérosols respiratoires dont la production est augmentée lors d'affections des voies aériennes supérieures.

Enfin, la contamination par l'environnement (surfaces d'ateliers de fabrication, outils de découpe) a été suggérée dans un épisode toxique survenu en 1997 (Anonyme, 1997). Lors de ce travail, nous avons

eu l'opportunité de réaliser une courte synthèse de cet épisode toxique. Les principales informations relatives à cet épisode sont exposées ci après. En septembre 1997, un épisode toxique survint lors d'un banquet pour un départ à la retraite. 31 participants sur les 125 furent malades. Des symptômes tels que des nausées (94 %), des vomissements (89 %) et des diarrhées (72 %) affectèrent les convives entre trois et six heures (3,4 heures en moyenne) après consommation des plats du banquet. Une prise en charge médicale fut nécessaire pour sept convives et deux furent hospitalisés.

L'enquête épidémiologique démontra que les toutes personnes malades avaient consommé du jambon pré-cuit.

Les analyses microbiologiques et immunochimiques réalisées sur les restes de jambon démontrèrent la présence de *S. aureus* et d'entérotoxines staphylococciques de type SEA.

Enfin, l'enquête apporta les éléments suivants sur la préparation du jambon : la veille, un jambon pré-cuit d'environ 8 kg fut acheté et rôti dans un four domestique pendant 1 heure 30 minutes à la température de 200 °C, ce qui exclut l'origine d'une contamination primaire du produit par *S. aureus*. Une fois rôti et encore tiède, ce dernier fut découpé à l'aide d'une trancheuse non nettoyée avant utilisation. Les tranches de jambon furent alors placées dans des petits récipients en plastique stockés dans une glacière pendant six heures puis transférés dans un réfrigérateur toute la nuit avant le service du lendemain. A ce stade, deux hypothèses sur l'origine de la contamination ont été formulées : contamination de *S. aureus* post cuisson par une trancheuse souillée ou contamination d'origine humaine par manipulation et défaut d'hygiène. L'enquête démontra que la personne ayant préparé le jambon ne souffrait d'aucune infection staphylococcique apparente ce qui laisse à penser que la trancheuse serait à l'origine de la transmission de *S. aureus* du couteau vers l'aliment.

S. aureus tolère des concentrations en sels pouvant atteindre 20% tout à fait compatible avec les teneurs de l'ordre de 3,5 % du jambon. De plus, compte tenu des plages de températures de croissance (7 à 48°C) et de toxinogénèse (10° à 48°C), la découpe du jambon encore tiède a pu permettre de disséminer la contamination sur toute la surface des tranches offrant ainsi à *S. aureus* des conditions idéales pour se développer et excréter des entérotoxines.

Enfin, le stockage de nombreuses tranches encore tièdes dans de petits récipients en plastique a pu nuire à un refroidissement rapide du jambon et a pu expliquer les fortes croissances de *S. aureus* nécessaires à la production d'entérotoxines.

Figure 10 : schéma d'une chaîne de contamination depuis un lait de brebis atteint d'une mammite subclinique à staphylocoques jusqu'au produit fromager final



2.5.3 Aliments favorables

S. aureus peut être isolé d'aliments très variés. Sa présence ne représente un risque que pour les aliments permettant sa multiplication rapide à une température favorable (Sutherland et Varnum, 2002). Pour devenir toxique, l'aliment doit constituer un milieu favorable à la croissance et à la toxinogénèse : riche en protéines, d'un pH voisin de la neutralité, ne renfermant pas de flore inhibitrice. Les aliments les plus « à risque » sont :

- Les aliments recontaminés après traitement thermique ou tout autre procédé éliminant la flore de compétition. Plus l'aliment est manipulé, plus le risque est élevé. Par exemple, viandes, volailles et jambon cuits et tranchés, salades composées y compris salades de riz ou de légumes, gâteaux à la crème, plats cuisinés manipulés après cuisson
- Les aliments fermentés à acidification lente permettant la croissance de *S. aureus* durant la fermentation. Par exemple, le fromage ou le salami. Le risque est augmenté si les ferments utilisés pour démarrer la fabrication sont déficients ou s'il n'y a pas de ferments ajoutés.
- Les produits séchés ou à teneur en eau réduite, dans lesquels la croissance de *S. aureus* a pu être favorisée à une des étapes de fabrication ou de stockage par une a_w réduite et une température favorable. Par exemple, le lait en poudre, les pâtes, les poissons séchés.

- Les plats ayant nécessité des manipulations (salades composées, plats cuisinés) et les produits laitiers ont été les aliments les plus fréquemment associés aux TIAC à staphylocoques rapportées en France de 1996 à 2007. *S. aureus* constituant l'agent le plus souvent mis en cause dans les TIAC dues à des produits laitiers, une étude a été réalisée sur 59 foyers de TIAC à staphylocoques impliquant ces produits pour tenter de déterminer la nature des produits incriminés et la part des produits au lait cru. Il était précisé pour la moitié de ces produits qu'ils étaient au lait cru mais le traitement du lait n'était pas indiqué pour l'autre moitié. Les fromages affinés représentaient le type de produits laitiers le plus fréquemment impliqué, notamment les fromages à pâte pressée non cuite (De Buyser et al., 2001).

2.5.4 Facteurs influençant la croissance et la production d'entérotoxines staphylococciques par *S. aureus*.

2.5.4.1 Température

L'aliment doit être maintenu pendant un certain temps à une température favorable à une croissance importante de *S. aureus* et à la production d'entérotoxines. On considère qu'une densité supérieure à 10^6 cellules de *S. aureus* par gramme d'aliment est nécessaire pour atteindre une quantité d'entérotoxine susceptible d'induire une TIA (Anonyme, 2003a). Plus on s'éloigne des températures optimum de croissance et de toxinogénèse, plus le temps nécessaire sera long. Il est de l'ordre de quelques heures à 37°C, quelques jours à température ambiante et de quelques semaines à 10°C dans des conditions optimales par ailleurs (Schmitt et al., 1990 ; Belay et Rasooly, 2002).

S. aureus peut se développer entre 7 et 48°C avec une température optimale à 37°C. Les effets de la température sur la croissance du germe dépendent du type de milieu utilisé et de la souche. Lors d'une étude portant sur 77 souches de *S. aureus* isolées de différentes matrices alimentaires Schmitt et al. (1990) ont montré que les températures de croissance étaient situées dans une plage comprise entre 35 et 40°C sans qu'il n'y ait de différence significative entre les souches. Les températures minimale et maximale de croissance étaient quant à elle distribuées de façon irrégulière entre 7 et 13 °C d'une part et entre 40 et 48°C d'autre part. La température minimale pour la production de toxines était distribuée de façon irrégulière entre 14 et 38°C avec une température optimale comprise dans une plage de 35 à 38°C. La température minimale de production de toxine a été démontrée comme étant égale à 15°C, température où la production à de faible niveau n'intervient qu'après 3 ou 4 jours de culture. Dans une autre étude, Tatini et al. (1973) rapportait une production de toxines à des températures de 10 °C sans préciser les conditions expérimentales mise en œuvre.

2.5.4.2 pH

La plupart des souches de *S. aureus* se développent à des pH compris entre 4 et 10 avec un optimum compris entre 6 et 7. Cependant, quand les autres paramètres influençant la croissance ne sont pas optimum, la gamme de pH toléré pour la croissance se réduit. A titre d'exemple, Smith et al. (1983) ont démontré qu'en conditions aérobie le pH minimal pour la croissance et la toxinogénèse était aux alentours de 4,0 alors qu'en conditions anaérobie les pH minimal pour la croissance et la toxinogénèse se situaient dans une gamme comprise entre 4,6 et 5,3. Le tableau 6 ci dessous présente une synthèse de différentes études conduites pour estimer les pH minimum de croissance et de toxinogénèse. La majorité des souches de *S. aureus* testées sont capables de produire des entérotoxines à des teneurs détectables sous condition aérobie à un pH de 5,1. Sous condition anaérobie, la plupart des souches ne sont pas capables de produire à des niveaux détectables des entérotoxines à un pH inférieur à 5,7.

Tableau 6 : pH minimum pour la production d'entérotoxines staphylococciques dans différents milieux

Milieu	Acidifiant	Conditions	pH minimum pour la croissance	pH minimum pour la production d'ES	Référence
Lait écrémé en poudre	HCl ou acide lactique	Pas de donnée	5,0 4,5: pas de croissance	5,0 (SEA)	Tatini, 1973
Jambon	Acide lactique	Anaérobie 30°C ; 7j	4,8 – 5,0: pas de croissance	-	Tatini, 1973
Jambon	Glucono-delta-lactone	Anaérobie 22 et 30°C	Pas de donnée	5,3 (SEB)	Tatini, 1973 Bergdoll, 1989
Viande	Pas de donnée	Aérobie	Pas de donnée	4,7 (SEC)	Tatini, 1973
Matrices alimentaires variées	Pas de donnée	Pas de donnée	5,0	5,0 (SEA, SEB, SEC, SED)	Tatini, 1973 Smith et al., 1983
Milieu de culture liquide	Pas de donnée	Aérobie	Pas de donnée	5,1 (SEB)	Smith et al., 1983
Milieu de culture liquide	Pas de donnée	Aérobie 37°C	Pas de donnée	5,02 (SEB) min. pH 9,08 (SEB) max. pH	Smith et al., 1983
Cheddar	-	-	Pas de donnée	5,4 (SEA)	Zehren et Zeheren, 1968
Mayonnaise	Pas de donnée	Aérobie 37°C ; 7j	Pas de donnée	5,1 (SEA, SEB, SEC, SED)	Genigeorgis, 1989

2.5.4.3 Activité de l'eau

Contrairement aux autres pathogènes alimentaires, *S. aureus* peut se développer dans une gamme d'activité de l'eau (a_w) comprise entre 0,86 – équivalent 20 % NaCl - (Qi et Miller, 2000) et 0,99 (Smith et al., 1983) en condition aérobie (0,90 à 0,99 en condition anaérobie). Les conditions a_w nécessaires pour la production de toxines dépendent quant à elles du type de toxine produite. Les toxines de type SEA et SED sont produites quelle que soit la valeur de l' a_w permettant la croissance de *S. aureus*. Les productions de SEB et SEC sont très sensibles à une réduction de l' a_w . Ces toxines sont fortement produites dès que l' a_w est égale à 0,93 (Ewald et Notermans, 1988 ; Qi et Miller, 2000). Pour la toxine de type SEE, Thota et al. (1973) ont montré que la production avait lieu dans un milieu contenant 10 % de NaCl (équivalent à une a_w de 0,92).

2.5.4.4 Facteurs nutritionnels

Tableau 7 : Effet des facteurs nutritionnels sur la production d'entérotoxines staphylococciques par *S. aureus*

Facteur	Activation	Absence d'effet	Répression	Référence
Magnesium ↑ Phosphate ↓ Potassium (30 mM) Ammonium Elements traces	SEB SEB	SEB SEB		Keller et al., 1978
Magnesium Fer	SEB, SEC SEB	SEA SEA, SEC		Morita et al., 1979
Hydrolysats de caséines	SEB			Bergdoll, 1989
Extrait de levure	SEA, SED			Halpin-Dohnalek et Marth, 1989
Glucose (≥ 0.30 %)			SEB	Morse et al., 1969
Glucose, glycerol			SEA, SEB, SEC	Jarvis et al., 1975
Lactose, maltose, sucrose, glucose, glucose + fructose (1% et 5%)		SEC		Woodborne et al., 1978
Proline, histidine, alanine, serine,	SEB (faible)			
Aspartate, glycine, threonine, glutamate			SEB	Smith et al., 1983
Pyruvate			SEB	Smith et al., 1983

2.5.5 Ingestion d'une dose suffisante

La dose à ingérer pour provoquer les premiers symptômes reste mal définie (Anonyme, 2003a). Cependant, plusieurs études ont tenté d'évaluer la dose minimale à ingérer pour provoquer les premiers symptômes.

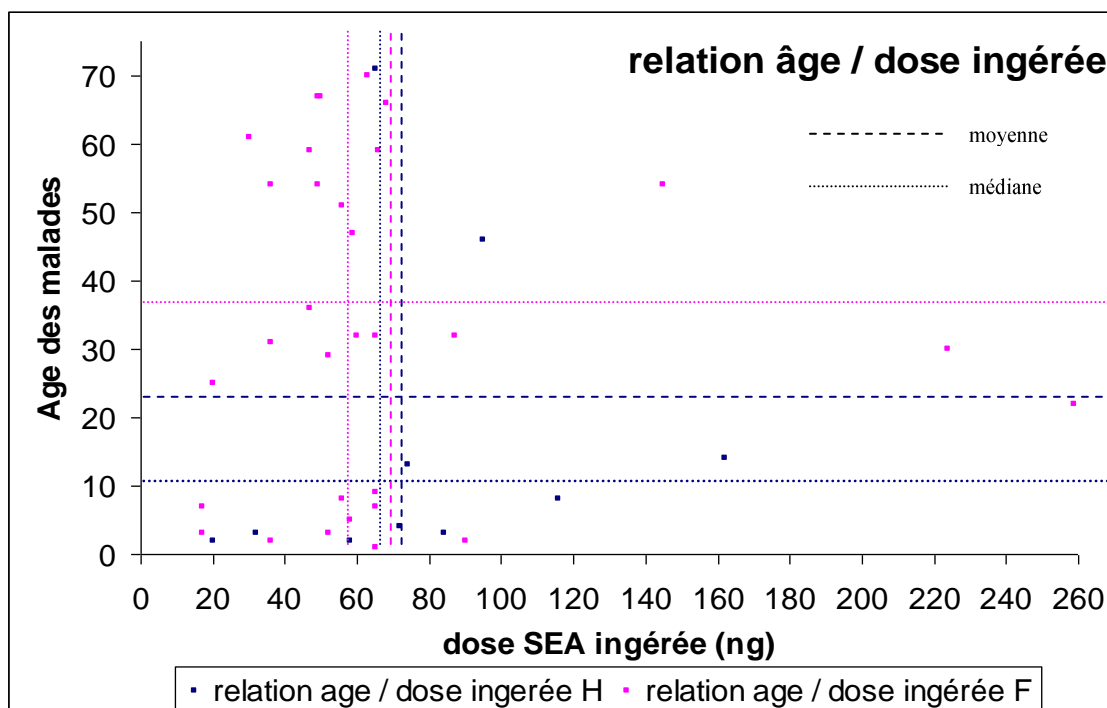
Mossel et al., (1995) citent une dose émétique 50 de 200 ng de toxines.kg⁻¹ de poids corporel par ingestion. Ils concluent qu'un homme doit ainsi ingérer entre 10 et 20 µg de toxines staphylococciques pour que les premiers symptômes se déclenchent. Des études sur volontaires humains ayant ingéré des toxines de types SEA, SEB ou SEC ont montré que la dose minimale provoquant une réponse émétique chez tous les volontaires était de 3,5 µg. Cependant chez les individus les plus sensibles, la dose ingérée pourrait être abaissée à 0,7 µg (Bergdoll, 1979). D'autres auteurs (Martin et al., 2001) confirment que l'ingestion de moins d'un microgramme d'entérotoxines staphylococciques déclenche les symptômes chez les individus les plus sensibles.

Enfin les études épidémiologiques réalisées à la suite de deux TIAC impliquant l'entérotoxine SEA et ayant atteint un grand nombre de malades, font état de doses ingérées comprises entre 20 et 144 ng pour déclencher les premiers symptômes chez les sujets les plus sensibles (Asao et al., 2003 ; Evenson et al., 1988 ; Ikeda et al., 2005).

Dans la TIAC survenue au Japon, il a été démontré par la suite (Ikeda et al., 2005) que le lait contaminé contenait de l'entérotoxine de type SEH en quantité égale à celle de l'entérotoxine de type SEA, ce qui porterait la dose minimum ingérée à 20 ng de SEA plus 20 ng de SEH, soit 40 ng d'entérotoxines (Figure 11).

Cet épisode a particulièrement mis en évidence le manque d'outils analytiques immédiatement disponibles pour caractériser les épisodes toxiques, le peu de données disponibles en terme de relation dose-effet, et l'absence d'information sur les éventuelles synergies inter-toxines. Afin de disposer d'informations sur les points énumérés précédemment, il conviendra tout d'abord de développer des outils analytiques capables de détecter et de quantifier précisément les toxines présentes dans les aliments suspectés.

Figure 11 : Détails des doses ingérées par 44 malades en fonction de leur sexe (31 Femmes / 13 Hommes) et âge d'après Asao et al. (2003)



3. Investigation des toxi-infections alimentaires collectives à staphylocoques à coagulase positive

Lorsque cette étude a débuté en 2006, le paquet hygiène entré en application en France par publication de la note de service NS/DGAL/SDSSA/N2006-8048 du 20 février 2006 (Anonyme, 2006e) relative au règlement (CE) n°2073/2005 du 15 novembre 2005 (Anonyme, 2005a) concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires.

Cette note de service précisait que la recherche des entérotoxines devait s'effectuer en deux temps : dénombrement par microbiologie conventionnelle des staphylocoques à coagulase positive par méthodes normalisées et recherche en cas de dépassement du critère M des entérotoxines staphylococciques de types SEA à SEE par méthodes commerciales.

Cette démarche était à appliquer dans deux cadres analytiques bien distincts : un cadre de contrôles officiels des produits laitiers, un cadre de suspicions de toxi-infections alimentaires collectives.

3.1 Méthodes de détection de *Staphylococcus aureus*

3.1.1 Isolement de *S. aureus* par microbiologie conventionnelle

3.1.1.1 Milieux sélectifs ou non

De nombreux milieux sélectifs ou non pour la recherche des staphylocoques ont été développés (Tableau 8). Les plus utilisés parmi les milieux non sélectifs sont les milieux solides tels que gélose au sang, gélose nutritive, gélose trypticase-soja (TSA), gélose cœur-cerveau (BHI agar), gélose P, gélose dénombrement au lait (Plate Count Agar + lait), et leurs équivalents en milieu liquide (BHI, bouillon TS). Les milieux sélectifs visent à inhiber les bactéries autres que *S. aureus* et à favoriser la croissance de *S. aureus*. Les agents sélectifs sont la concentration élevée en NaCl qui permet de réduire l' a_w , comme dans la gélose de Chapman, ou la concentration en chlorure de lithium, glycine et tellurite de potassium, agents retenus dans le milieu de Baird- Parker (BP) et ses dérivés, ou d'autres agents (Tableau 9). Si nécessaire, la sulfaméthazine peut être ajoutée pour inhiber la croissance des *Proteus spp.* La sélectivité peut aussi être augmentée en ajoutant de l'acriflavine et de la polymyxine E (colistine) ou en élevant la température d'incubation jusqu'à 42°C mais plus le milieu sera sélectif, plus il sera inhibiteur pour les souches de *S. aureus* stressées.

Certains agents sont utiles à la caractérisation différentielle des colonies (jaune d'œuf et tellurite pour le BP, Tableau 8). Le milieu BP représente le milieu de choix en bactériologie alimentaire car il permet la meilleure récupération des souches de *S. aureus* stressées grâce au pyruvate de sodium, activateur de croissance (dégrade H₂O₂), et à l'effet protecteur du jaune d'œuf. Cependant, ce milieu présente l'inconvénient d'être insuffisamment sélectif en présence de flores mixtes. C'est pourquoi, plusieurs variantes du BP ont été proposées (Tableau 9). Certaines variantes ont été jugées trop sélectives pour les cellules stressées de *S. aureus* et il a été proposé une étape préliminaire de réparation d'une heure sur base BP sans agents sélectifs avant l'ajout du milieu très sélectif (Isigidi et al., 1989). Une des variantes retenues dans les méthodes normalisées est le BP-RPF où le plasma de lapin enrichi en fibrinogène (Rabbit Plasma Fibrinogen) remplace le jaune d'œuf et permet de repérer *in situ* les colonies à coagulase positive (Beckers et al., 1984).

Enfin, bien que les milieux BP et BP-RPF soient les plus utilisés, d'autres milieux semi-solides (Vogel et Johnson, milieux chromogènes, gélose 4S, ...) ou liquides sélectifs (bouillon hypersalé, BP liquide, bouillon de Giolitti et Cantoni, bouillon Trypticase Soja + NaCl, ...) ont été décrits.

Tableau 8 : Milieux sélectifs pour la détection de *S. aureus* : exemple des différents agents sélectifs utilisés et des différents caractères recherchés

Milieu	Agent(s) sélectif(s)	Caractère diagnostique	Référence
Mannitol-sel	Chlorure de sodium	Fermentation du mannitol	Chapman, 1945
Mannitol-sel-acriflavine	Chlorure de sodium Acriflavine (contre SCN et entérocoques)	Fermentation du mannitol	Davies et al., 2006
Baird-Parker (BP) (universel)	Tellurite de potassium Glycine Chlorure de lithium	Colonies noires Eclaircie du jaune d'oeuf	Baird-Parker, 1962
Baird-Parker – Rabbit plasma fibrinogène (BP-RPF)	Tellurite de potassium Glycine Chlorure de lithium	Coagulase Colonies blanches, grises ou noires	Beckers et al., 1984
Vogel et Johnson modifié (USA)	Tellurite de potassium Glycine Chlorure de lithium	Colonies noires Fermentation du mannitol DNase	Andrews et Martin, 1978
4S	Chlorure de sodium Tellurite de potassium Incubation à 42°C	Eclaircie du jaune d'œuf Colonies grises à gris foncé	Mintzer-Morgenstern et Katzenelson, 1982
KRANEP (utilisé en Allemagne)	Thiocyanate de potassium Chlorure de lithium Azide de sodium Cycloheximide (antifongique)	Fermentation du mannitol Eclaircie du jaune d'œuf Pigment	Sinell et Baumgart, 1967
Columbia CNA	Acide nalédixique Sulphate de colistine	Pigment Hémolyse	Ellner et al., 1966
Chromogène - CHROMagar Staph. aureus - <i>S. aureus</i> ID (biométrieux)		Couleur spécifique des colonies de <i>S. aureus</i> Mauve (principe breveté) Verte (α -glucosidase)	Gaillot et al., 2000 Perry et al., 2003

3.1.1.2 Méthodes quantitatives et qualitatives

Habituellement, les SCP sont dénombrés sur milieux sélectifs solides. Les milieux sont ensemencés en surface par étalement direct de 0,1 mL de l'échantillon à tester (en général, la suspension-mère au 1/10^{ème} de l'aliment et ses dilutions décimales) puis incubés de 24 à 48 heures à 37°C. Après incubation, les colonies d'aspect caractéristique sont, si nécessaire, soumises à un test de confirmation puis dénombrées. Le résultat peut être donné en nombre d'unités formant colonies (ufc) par g ou par mL d'aliment.

Lorsqu'il est nécessaire de dénombrer un petit nombre de SCP, une étape d'enrichissement en milieu sélectif liquide est nécessaire avant l'isolement sur milieu sélectif solide. La méthode du nombre le plus probable (NPP) permet une estimation du nombre de *S. aureus* par g ou par mL dans l'échantillon testé. La même méthode, simplifiée, devient une méthode de recherche qualitative permettant d'obtenir un résultat de type « présence ou absence de SCP dans x grammes d'aliment ».

Tableau 9 : Modifications apportées au milieu de Baird-Parker

Agent sélectif ou différentiel supplémentaire	Objectif	Référence
sulphaméthazine	Inhibition des <i>Proteus</i> spp	Smith et Baird-Parker, 1964
Acriflavine +/- polymyxine B ou E (= colistine)	Inhib. SCN et entérocoques	Devriese, 1981
Base BP 1h puis surcouche de BP acriflavine	revivification des Sa stressées	Isigidi et al., 1989
Incubation à 42°C	Pb : inhib Sa stressées	Van Netten et al., 1990
Azide de sodium	Inhib. Flores diverses eaux usées	Lebaron et Baleux, 1988
Surcouche de milieu ADN-bleu de toluidine après 24h	Détection de la DNase thermostable	Lachica, 1984
Plasma au lieu du jaune d'oeuf	Détection de la coagulase	Devoyod et Millet, 1976
Cycloheximide à 0,4 g/l dans BP-RPF	Inhib moisissures et levures (des croûtes de fromages)	De Buyser, non publié

3.1.2 Détection de *S. aureus* par méthodes moléculaires

3.1.2.1 Caractérisation moléculaire des souches de *S. aureus*

Parmi les nombreuses méthodes décrites pour typer les souches de *S. aureus*, les méthodes phénotypiques telles que le typage par phages (Blair et Williams, 1961) et le sérotypage capsulaires (Karakawa et al., 1985 ; Boutonnier et al., 1989) ont été délaissées car beaucoup moins discriminantes que les méthodes moléculaires. Parmi ces dernières, certaines sont utilisées pour classer les souches au sein d'une espèce comme le ribotypage (De Buyser et al., 1989) ou pour typer des souches à des fins épidémiologiques par utilisation de l'électrophorèse en champs pulsés (Prévost et al., 1992 ; Schlichting et al., 1993 ; Akidenen et al., 2001). Cette technique a été utilisée avec succès pour typer les souches de *S. aureus* isolées de différentes matrices alimentaires (Tsen et al., 1997 ; Vanderlinde et al., 1999 ; Hennekinne et al., 2003 ; Rusikova et al., 2008).

3.1.2.2 Caractérisation du pouvoir toxigène des souches

Dès 1990, la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) a été appliquée à la recherche des gènes de *S. aureus* dans l'ADN d'extraits alimentaires et non plus uniquement dans l'ADN de souches en culture pure. Les gènes ciblés ont été préférentiellement ceux codant les entérotoxines mais ces derniers n'étant pas systématiquement présents chez *S. aureus*, le choix s'est également porté sur des gènes spécifiques de cette espèce, comme le gène *nuc* de la thermonucléase (tableau 10). Ikeda et al. (2005) ont détecté les gènes d'entérotoxines *sea*, *seh*, *seg* et *sei* par PCR dans du lait écrémé en poudre responsable d'une TIAC. Aucun *S. aureus* n'avait été retrouvé dans l'aliment. Leur résultat a été confirmé par la mise en évidence d'entérotoxines de type SEA et SEH dans le lait en poudre. SEG et SEI étaient peut-être également présentes mais elles n'ont pas été recherchées. Depuis 2001, l'utilisation de méthodes PCR quantitatives en temps réel donne le nombre de copies d'ADN retrouvé. Ce dernier étant linéairement corrélé avec le nombre de bactéries, cela permet d'estimer le niveau de contamination de l'aliment par *S. aureus*. Ceci est particulièrement intéressant dans les aliments ayant subi une contamination à une étape de leur fabrication mais dont les bactéries ont été inactivées ultérieurement, à condition que l'ADN n'ait pas été dégradé. Goto et al. (2007) ont retrouvé un peu moins d'ADN cible dans un lait contaminé puis pasteurisé à 63°C - 30 min que dans le même lait pasteurisé à 72°C - 15s. Ils évoquent une perte d'ADN liée à la lyse cellulaire pendant la pasteurisation. Leur limite de détection est d'environ 600 ufc/ml dans les échantillons de lait pasteurisé alors qu'elle est de 10 ufc/ml dans le lait cru. Les limites de détection de la PCR varient d'une étude à l'autre. Est mis en cause le protocole d'extraction de l'ADN qui doit tenir compte de la complexité des aliments, de leur teneur en graisses, et de la présence d'inhibiteurs éventuels pour obtenir une méthode suffisamment sensible et reproductible. La PCR n'est pas encore beaucoup utilisée dans les aliments par manque de critères de standardisation. Alarcon et al. (2006) décrivent une PCR optimisée, applicable en routine, quantitative et automatisée. Ces auteurs préconisent 24 heures d'enrichissement puis une purification de l'ADN par DNeasy tissue kit (Qiagen) avant PCR conventionnelle ou une QRT-PCR SYBR-Green, 10 fois plus sensible que la PCR conventionnelle. Goto et al. (2007) préconisent cinq lavages du culot bactérien issu du lait avant extraction de l'ADN pour avoir un résultat reproductible.

Le nombre d'ufc/g est souvent bien corrélé au nombre de copies du gène/g mais Hein et al. (2005) ont observé de grandes différences entre les deux, avec 100 à 1000 voire plus fois plus de copies du gène que d'ufc/g dans du lait cru congelé. Il ne faut pas chercher une corrélation systématique entre le nombre d'unités formant colonies et le nombre de copies d'ADN car après certains procédés subis par l'aliment, soit l'ADN peut être dégradé soit les bactéries peuvent être non revivifiables, ou mortes.

Tableau 10 : méthodes PCR utilisées pour la détection de gènes de *S. aureus* dans l'ADN extrait d'aliments contaminés

Gènes détectés	Protocole	Extrait alimentaire	Contamination	Limite de détection (UFC/g)	Référence
<i>seb, sec, nuc</i>	PCR simplex conventionnelle	Lait écrémé en poudre	artificielle	10 ⁵	Wilson et al., 1991
<i>sea à sei, tst</i>	idem	Variés	Artificielle et naturelle	2. 10 ⁵ pas applicable aux produits laitiers	Mac Lauchlin et al., 2000
<i>nuc, sec, seg, seh, sei</i>	idem	Lait cru	artificielle	10 ⁴ à 10 ⁷	Ercolini et al., 2004
<i>sec, nuc</i>	PCR multiplex	Pr. laitiers	artificielle	100 (lait) 5 (cheddar)	Tamarapu et al., 2001
<i>sea à see</i>	idem	variés	artificielle	10	Wang et al., 2002
<i>nuc</i>	QRT*-PCR TaqMan probe +light cycler	3 fromages	artificielle	75 à 320	Hein et al., 2001
Kit Staph. DNA	QRT-PCR Light cycler capillaires	variés	naturelle	5	Berrada et al., 2006
<i>nuc</i>	PCR ou QRT-PCR Sybr-green optimisé	Boeuf cru 164 alim. Variés + enrich	artificielle et naturelle	10 à 1000	Alarçon et al., 2006
Sa0836, régulateur transcriptionnel de <i>S. aureus</i>	QRT-PCR TaqMan probe +ABI prism 7000	Lait (avec 5 lavages PBS avant extr)	artificielle	10 (lait cru) 600 (lait past)	Goto et al., 2007

Bien que sensible et spécifique, les résultats obtenus par PCR ne permettent que la mise en évidence du ou des gène(s) codant(s) pour les entérotoxines staphylococciques. Ainsi, les efforts récents ont porté sur la mise en place de méthodologies de type reverse transcriptase PCR (RT PCR) capables d'estimer le niveau d'expression des gènes codants pour les entérotoxines staphylococciques (Lee et al., 2007 ; Akineden et al., 2008)

3.1.3 Méthodes normalisées et alternatives

Compte tenu de la réglementation et du caractère obligatoire de la déclaration des épisodes toxiques il est nécessaire de recourir à des méthodes robustes et éprouvées pour rechercher les staphylocoques à coagulase positive et les entérotoxines, ceci ce faisant au travers de méthodes normalisées ou alternatives.

La normalisation a pour objet de fournir des normes, ou documents de référence, apportant des solutions consensuelles à des problèmes techniques se posant dans la relation client-fournisseur. Dans son acception internationalement reconnue, la norme est « un document, établi par consensus et approuvé par un organisme reconnu, qui fournit, pour les usages communs et répétés, des règles, des

lignes directrices ou des caractéristiques, pour des activités ou leurs résultats, garantissant un niveau d'ordre optimal dans un contexte donné ». Généralement laborieuses à mettre en œuvre pour les opérateurs, les méthodes normalisées peuvent être complétées par des méthodes dites alternatives ayant les mêmes caractéristiques de réponses (nécessité d'une validation par rapport à la méthode de référence décrite dans la norme) mais dont la mise en œuvre sera plus simple, plus rapide et moins coûteuse.

3.1.3.1 Méthodes normalisées

S. aureus est habituellement dénombré dans les aliments selon des méthodes normalisées.

Il existe des méthodes de référence décrites dans des normes internationales reprises au niveau européen et français (NF EN ISO 6888-1, -2 et -3) (Anonyme, 1999ab ; 2003b). Il s'agit de techniques classiques de comptage des colonies sur milieu sélectif gélosé après inoculation directe de dilutions décimales de l'aliment et incubation à 37°C. Seule la norme ISO 6888-3 décrit une méthode de recherche et un dénombrement par la technique du nombre le plus probable (NPP) après une étape d'enrichissement. Le milieu sélectif d'enrichissement décrit dans cette norme est le bouillon de Giolitti et Cantoni modifié dont la formule est proche de celle du milieu BP liquide. Après enrichissement, *S. aureus* est détecté par isolement d'une anse de bouillon et incubation sur milieu sélectif gélosé.

Les normes ci-dessus n'ont retenu que deux types de milieux sélectifs gélosés, le milieu de BP et le BP-RPF. Les méthodes utilisant le BP nécessitent de soumettre plusieurs colonies d'aspect caractéristique et non caractéristique à un test de confirmation, la recherche de la coagulase en tube. Les méthodes utilisant le BP-RPF ne nécessitent pas de test de confirmation. Quel que soit le milieu utilisé, les colonies à coagulase positive sont dénombrées et le résultat est exprimé en unités formant colonies (ufc) de staphylocoques à coagulase positive (soit principalement *S. aureus*) par g ou par mL d'aliment (De Buyser et Sutra, 2005). La fidélité en terme de répétabilité et reproductibilité des méthodes décrites dans les normes ISO 6888-1 (BP) et -2 (BP-RPF) a été évaluée lors d'un essai interlaboratoires réalisé avec trois types d'aliment et quatre niveaux de contamination par *S. aureus*. La fidélité des deux méthodes a été jugée satisfaisante, celle obtenue avec le BP-RPF étant toutefois meilleure que celle obtenue avec le BP, et il a été décidé de donner un statut égal à ces deux méthodes pour le dénombrement des SCP dans les aliments (De Buyser et al., 2003). Cependant, le BP-RPF est recommandé pour dénombrer les SCP dans les fromages au lait cru et toute denrée renfermant des flores annexes rendant la lecture sur BP difficile (De Buyser et al., 1998).

En ce qui concerne la détection par PCR, il n'existe pas encore de norme spécifique pour *S. aureus* mais une série de normes réunies sous le titre générique Microbiologie des aliments- Réaction de

polymérisation en chaîne (PCR) pour la détection de micro-organismes pathogènes dans les aliments fournissent des principes généraux utiles, en particulier :

- la norme ISO 22174 (Anonyme, 2005c) : Exigences générales et définitions
- la norme NF EN ISO 20837 (Anonyme, 2006a) relative à la préparation de l'échantillon pour une détection qualitative par PCR. Cette norme décrit un protocole d'extraction de l'ADN à partir d'un bouillon sélectif d'enrichissement, validé par EIL pour deux bactéries Gram-négatives.
- la norme NF EN ISO 20838 (Anonyme, 2006b) relative à l'amplification et à la détection qualitative. Cette norme décrit également les modes de confirmation de l'identité du produit PCR obtenu et des remarques sur optimisation des essais.

3.1.3.2 Méthodes alternatives

S. aureus peut être également dénombré dans les aliments par des méthodes alternatives commercialisées, plus faciles d'emploi et/ou plus rapides que les méthodes normalisées. Pour pouvoir être utilisées à la place d'une méthode normalisée lors des contrôles officiels, ces dernières doivent être testées selon un protocole reconnu de validation, incluant des essais comparatifs avec une méthode de référence et une étude collaborative. Le Petrifilm™ Staph Express (3M) et le Rapid'Staph Test (Bio-Rad) ont été validés par l'AFNOR en 2003 et en 2005, respectivement.

Le système Petrifilm™ Staph Express comprend un test Petrifilm contenant un milieu chromogène sélectif et différentiel pour *S. aureus* et un disque de confirmation permettant d'observer l'activité Dnase des colonies. Après ensemencement et incubation du test pendant 24 heures à 37°C, *S. aureus* forme des colonies rouge-violet. Si des colonies d'une autre coloration sont visibles, le disque de confirmation est appliqué sur le test pendant 3 h à 37°C. Les zones roses apparues correspondent à *S. aureus*.

Le Rapid'Staph Test est un milieu de Baird-Parker optimisé pour une lecture en 24 heures (au lieu de 48 heures dans la norme ISO 6888-1). Deux tests de confirmation à pratiquer sur les colonies caractéristiques sont proposés au choix, un test rapide d'agglutination sur latex sensibilisé (Pastorex^R Staph-plus, Bio-Rad) ou une piqûre sur gélose BP-RPF permettant de repérer les colonies à coagulase positive après 18h d'incubation à 37°C.

3.2 Méthodes de recherche des entérotoxines staphylococciques

Compte tenu de leur nature protéique, de leur faible poids moléculaire, des concentrations très faibles généralement retrouvées dans les aliments (< 0,1 ng/g) et de la complexité de composition de ces derniers, la recherche des entérotoxines staphylococciques dans les aliments est délicate à réaliser.

Cette dernière nécessite tout d'abord sur une étape d'extraction suivie d'une concentration ayant pour but d'isoler les entérotoxines staphylococciques des autres constituants des matrices alimentaires puis de les concentrer. La seconde étape requiert une étape de reconnaissance dont l'objectif peut s'étendre de la simple détection globale (détection / non détection) à la caractérisation voire la quantification des différents types d'entérotoxines.

3.2.1 Extraction

Plusieurs méthodes d'extraction suivies d'une phase de concentration de ces toxines bactériennes ont été développées et utilisent les principes énoncés ci-dessous.

3.2.1.1 Chromatographie par perméation de gel

La chromatographie par perméation de gel permet de séparer les différents constituants d'une solution protéiques en fonction de leurs poids moléculaires (Ende et al., 1983 ; Lei et al., 1988 ; Reynolds et al., 1988 ; Dickie et Aktar, 1989). Ces méthodes sont réservées à la purification d'entérotoxines issues de surnageants de culture de staphylocoques à coagulase positive. Compte tenu de la faible concentration des entérotoxines dans les matrices alimentaires, ces méthodes s'avèrent insuffisantes pour la détection dans les aliments.

3.2.1.2 Immunochromatographie

L'immunochromatographie repose sur l'utilisation d'un gel sur lequel ont été greffés des anticorps anti entérotoxines staphylococciques (Shinagawa et al., 1991 ; Lapeyre et al., 2001). Dans cette méthode l'échantillon à tester est déposé puis passe au travers du gel (généralement sous format d'une colonne). Si des entérotoxines staphylococciques sont présentes dans l'extrait testé, ces dernières vont se lier de façon non covalente aux anticorps du gel, les autres protéines constituant l'extrait passant au travers du gel sans être capturées. Les entérotoxines retenues sont ensuite éluées par différents systèmes (concentrations en sels, pH...). L'inconvénient principal de ces méthodologies réside dans la disponibilité d'anticorps spécifiques aux différentes entérotoxines staphylococciques décrites.

3.2.1.3 Concentration des protéines totales

Enfin, plusieurs méthodes de concentration des protéines totales ont été développées. Le principe d'une concentration de l'extrait par dialyse contre une solution de polyéthylène glycol 20000 à 30 % p/v a été développé puis caractérisé par Macaluso et al. (1998), tandis que Meyrand et al. (1999) lui préférerait une précipitation par l'acide trichloracétique moins longue à mettre en oeuvre. Plus récemment, Sojeima et al. (2004) ont proposé une méthode de concentration par ultrafiltration membranaire et centrifugation.

3.2.2 Détection

Habituellement, pour détecter un contaminant de nature protéique, quatre méthodologies de détection de principes différents peuvent être utilisées : les bioessais (ou essai sur animaux), les méthodes utilisant l'outil moléculaire, les méthodes utilisant la physicochimie séparative des protéines et les méthodes utilisant les réactions antigènes anticorps dites immunologiques.

3.2.2.1 Les bioessais

Deux types de bioessais peuvent être décrits : les bioessais *sensu stricto* utilisant des animaux et les bioessais sur lignées cellulaires capables de mettre en évidence une ou plusieurs propriétés des contaminants recherchés sur des lignées cellulaires spécifiques.

Le principe du bioessai *sensu stricto* est fondé sur la capacité d'un extrait contenant des entérotoxines à induire chez l'animal l'ayant ingéré des symptômes gastro-intestinaux tels que les vomissements ou les diarrhées. En effet, historiquement les entérotoxines staphylococciques ont été décrites grâce à leur activité émétique lors d'essai par voie orale sur singes ou par voie intra péritonéale chez des chatons (Surgalla et al., 1953 ; Bergdoll 1979). Chez les animaux les plus sensibles et les plus facilement manipulables tels que la musaraigne (Hu et al., 2003) les symptômes apparaissent si la dose ingérée est supérieure à 200 ng (Figure 12). Cette dose étant supérieure à celle généralement décrite dans les études épidémiologiques réalisées suite à des intoxications alimentaires (Evenson et al., 1988 ; Asao et al., 2003 ; Ikeda et al., 2005), l'emploi de ces bioessais ne permet pas d'assurer une sécurité sanitaire suffisante du consommateur et d'autres méthodologies de détection doivent être utilisées.

Enfin, un bioessai fondé sur l'activité superantigénique des entérotoxines a été développé (Hawryluk et Hirshfield, 2002) et permet de détecter des concentrations picomolaires d'entérotoxine

staphylococcique de type A. Cette méthode, délicate à mettre en œuvre ne saurait ainsi être utilisée pour détecter en routine les entérotoxines staphylococciques dans les matrices alimentaires.

Figure 12 : action émétique de l'entérotoxine de type SEA après ingestion par des musaraignes d'après Hu et al. 2008 (ISSSI 08, Cairns, Australie)



vomissures

3.2.2.2 L'outil moléculaire

Bien que ce type de méthode soit couramment utilisée pour caractériser les contaminations bactériennes, il n'en est pas de même pour certains de leurs métabolites. En effet, ces méthodologies permettent de détecter grâce à des amorces cibles spécifiques un ou plusieurs gènes codants pour un ou plusieurs facteurs de virulence mais pas leur produits d'expression. Cependant, afin d'augmenter la sensibilité des méthodes immuno-chimiques (cf infra), Rajkovic et al. (2006) ont développé un test de type ELISA simple sandwich anti SEB en substituant l'enzyme sur l'anticorps de révélation et la remplaçant par une séquence d'ADN à amplifier (immunoPCR) (Figure 13). Les limites de détection d'une telle méthodologie dans les matrices alimentaires testées étaient inférieures à 0,01 ng/mL tandis que celles de l'ELISA utilisé étaient de l'ordre de 1,5 ng/mL. Compte tenu de sa spécificité (pas de réaction croisée avec SEA, SEC, SED et SEE) et de sa sensibilité, le développement de ce type de méthode mériterait d'être poursuivi.

Figure 13 : Représentation schématique du principe de l'immuno-PCR d'après Rajkovic et al. (2006)

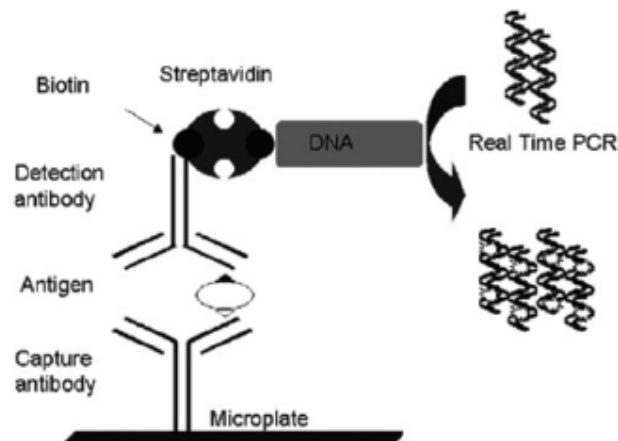


FIG. 1. Schematic diagram of the sandwich iPCR model using the same capture and detection antibody for recognition of different epitopes on an antigenic molecule. Reprinted from reference 14 with permission from the American Association for Clinical Chemistry.

De même, Fisher et al. (2007) ont développé un test d'immuno-PCR double sandwich et annoncent des limites de détection comprises entre 0,6 et 6 pg/mL pour les toxines de type SEB et SEA respectivement.

3.2.2.3 L'outil immunochimique

La détection des entérotoxines staphylococciques dans les aliments requiert des méthodes plus sensibles que celles utilisées pour étudier le potentiel entérotoxigène des souches car les concentrations présentes dans les aliments sont généralement comprises entre 0,05 et 20 ng de toxines par gramme d'aliment. C'est pourquoi, à l'heure actuelle, la majorité des méthodes de détection des entérotoxines staphylococciques sont fondées sur l'utilisation d'anticorps anti-entérotoxines. Plusieurs principes ont été développés : l'immunodiffusion sur gélose, les techniques radio-immunologiques (RIA), l'agglutination passive sur billes de latex (RPLA) et les essais immunoenzymatiques (EIA).

3.2.2.3.1 Immunodiffusion en gélose

Trois méthodes de diffusion sur gélose ont été développées : Casman et al. (1969) ont été les premiers à mettre au point une technique semi-quantitative de détection des entérotoxines dans des extraits alimentaires avec une limite de détection de 100 ng d'entérotoxines par mL d'extrait. Suite à cette méthode, plusieurs variantes ont été développées pour détecter les entérotoxines dans les surnageants de culture (Robbins et al., 1974 ; Meyer et al., 1980) mais elles ne se sont pas révélées assez sensibles

pour détecter les entérotoxines dans les extraits alimentaires. Ces méthodes ont été peu à peu abandonnées au profit de méthodes plus sensibles (cf infra) sauf aux Etats-Unis où elles demeurent des méthodes d'analyses officielles de l'Association of Official Agricultural Chemists (AOAC).

3.2.2.3.2 Méthodes radio-immunologiques

Les essais radio-immunologiques ont été les premiers dont la limite de détection était inférieure à 1 ng par gramme d'aliment (Miller et al., 1978 ; Janin et al., 1983). Bien que ces méthodes se soient avérées très sensibles, l'utilisation de radionucléides tels que l'iode 125 a rapidement posé des problèmes de sécurité aux personnels de laboratoire. C'est pourquoi ces méthodes ont peu à peu disparu dans la plupart des laboratoires de contrôle.

3.2.2.3.3 Agglutination passive sur billes de latex

Parmi les kits de détection des entérotoxines staphylococciques disponibles sur le marché, le kit RPLA utilise des anticorps spécifiques anti-entérotoxines liées à des billes de latex. Si les entérotoxines sont présentes dans l'extrait à analyser, un complexe se forme entre les billes de latex qui agglutinent. La limite de détection de cette méthode est d'un nanogramme d'entérotoxines par gramme d'extrait ce qui se révèle insuffisant dans le cas de faible contamination (cf supra).

3.2.2.3.4 Méthodes immunoenzymatiques

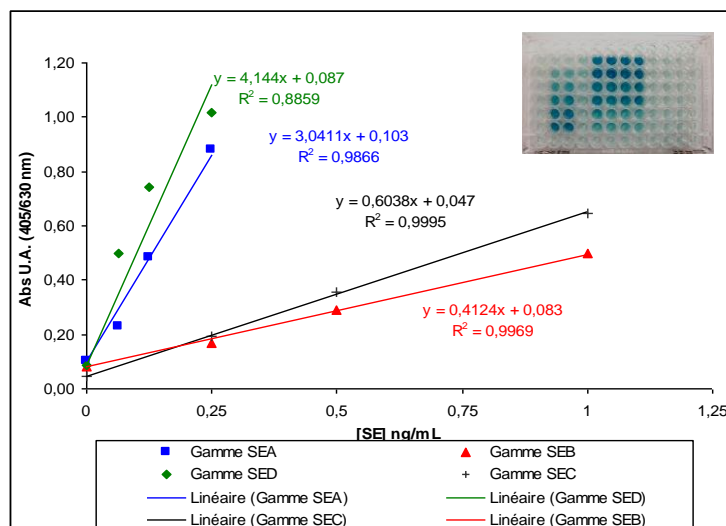
Afin de pouvoir détecter de faibles concentrations d'entérotoxines dans les extraits alimentaires et de pallier aux problèmes de sécurité rencontrés avec les tests radio-immunologiques, des techniques immunochimiques de type ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) ont été développées (Freed et al., 1982).

Afin d'améliorer l'investigation des toxi-infections alimentaires en France, Lapeyre et al. (1987 ; 1988) ont mis au point un test ELISA quantitatif et spécifique des entérotoxines A, B, C, D. La limite de détection de ce test est inférieure à 0,1 ng d'entérotoxine par gramme de matrice alimentaire (Figure 14).

Plus récemment, différents auteurs (Schotte et al., 2002 ; Khreich et al., 2008) ont mis au point une méthode rapide de détection de l'entérotoxine B par système d'immuno-chromatographie portable sous forme de bandelette stick. Ce système, difficilement applicable à la recherche de la toxine de type SEB

dans les extraits alimentaires, a été développé pour faire face à une éventuelle menace bioterroriste pour faire face à une contamination des réservoirs d'eau potable.

Figure 14 : exemple de plaque de quantification de la toxine SEA selon la méthode développée par Lapeyre et al. (1988)



Le tableau 11 présente quelque uns des kits commerciaux disponibles pour la recherche des entérotoxines staphylococciques.

Tableau 11 : Caractéristiques des kits commerciaux de détection des entérotoxines de *S. aureus*

Kit de détection	Principe	Entérotoxines détectées	Seuil de détection (ng/mL)	Durée d'analyse (h) ¹
RIDASCREEN	ELISA ²	A à E ³	0,1-0,75	2,5
TECRA Unique SET	ELISA	A à E	0,5-1,25	4
TRANSIA plate SET	ELISA	A à E	0,2	1,5
SET-RPLA	RPLA ⁴	A à D ³	0,5-1,0	20-24
VIDAS SET2	ELFA ⁵	A à E	0,25-0,5	1,5

1 : hors temps d'extraction

2 : Enzyme linked immunosorbent assay

3 : différenciation des différents types d'entérotoxines staphylococciques

4 : Reverse passive latex agglutination

5 : Enzyme linked fluorescent assay

Tous les kits nécessitent une extraction préalable des entérotoxines de l'aliment à l'aide d'eau physiologique ou d'un tampon salin. Cette étape d'extraction est extrêmement importante car elle conditionne le rendement d'extraction et la fiabilité du résultat final. Le mode opératoire est généralement simple mais peut être plus complexe pour certaines catégories d'aliments afin d'optimiser la récupération des entérotoxines. C'est ainsi que, dans le cadre des contrôles à effectuer dans les produits laitiers suivant le règlement CE 2073/2005 (Anonyme, 2005a), le Laboratoire Communautaire de Référence pour les staphylocoques à coagulase positive (AFSSA-LERQAP) a défini une méthode comprenant une étape d'extraction suivie d'une concentration de l'extrait par dialyse et une étape de détection immuno-enzymatique.

Alors que dans le cas des kits TECRA et RPLA, les résultats peuvent être lus à l'œil nu, les kits RIDASCREEN, TRANSIA et VIDAS nécessitent un appareil de lecture. Certains kits utilisent des sérums monovalents qui permettent la détection et l'identification des différents types d'entérotoxines (RIDASCREEN et RPLA), d'autres utilisent des sérums polyvalents qui détectent les entérotoxines de A à E mais sans différencier les types. Tous les kits présentent un seuil de détection très bas. Un seuil inférieur à 0,5 ng d'entérotoxine par ml d'extrait permet de détecter moins de 1 ng par gramme d'aliment lorsque ce dernier est dilué au demi. Il est nécessaire d'atteindre des niveaux de détection aussi bas, les entérotoxines étant le plus souvent présentes en faible quantité dans les aliments responsables de TIAC.

Cependant, ces méthodes comportent des limites car les résultats sont parfois difficiles à interpréter en raison de :

- la perte éventuelle des entérotoxines en cours d'extraction ou une répartition inégale des toxines dans l'échantillon ou encore, la présence d'entérotoxines non détectables par le kit, ce qui entraîne des résultats faux-négatifs
- l'existence d'interférences liées à des constituants de l'aliment pouvant entraîner des résultats faux-positifs.

3.2.2.4 L'outil physicochimique

3.2.2.4.1 Electrophorèse capillaire

Il n'existe que très peu de données bibliographiques concernant la technique utilisant l'électrophorèse capillaire appliquée aux protéines. Aucune donnée n'a été trouvée spécifiquement pour les entérotoxines staphylococciques dans les matrices alimentaires.

Cependant Tomlinson et al. (1995) ont mis en évidence que l'électrophorèse capillaire peut être appliquée aux bio-molécules telles que les peptides et les protéines en solutions standards.

Lam et al., (1999) ont utilisé l'électrophorèse capillaire couplée à une détection par fluorescence pour détecter l'entérotoxine de SEA en solution tampon à des concentrations de l'ordre de 0,3 à 6,5 nM (8,3 à 180 ng/mL). Aucune réaction croisée n'a été trouvée entre les entérotoxines SEA et SEB. Cette technique a été appliquée à des solutions standards de SEA.

3.2.2.4.2 Chromatographie liquide haute performance

Historiquement, la chromatographie liquide haute performance (CLHP) a été utilisée pour purifier les entérotoxines de staphylocoques à partir de surnageants de culture en vue de produire des standards et des solutions immunogènes.

Dès 1983, Williams et al. comparaient différentes résolutions chromatographiques d'exclusion, d'échange d'ions et de phase inverse pour la purification et la caractérisation de SEB. L'intérêt de la purification des entérotoxines a été développé pour son utilisation dans les essais immunologiques. La chromatographie en phase inverse permettait, quant à elle, la résolution des protéines de bas poids moléculaire (28 kDa) telles que SEB.

En 1989, une étude menée par Strickler et al. présentait une méthode rapide de purification de SEB par CLHP. Deux étapes chromatographiques étaient nécessaires : une étape de chromatographie en phase inverse avec gradient d'élution d'acétate d'ammonium - acétonitrile avec ajout d'acide trifluoroacétique suivie d'une étape de chromatographie d'échangeuse de cations. Les auteurs ont ainsi démontré la capacité d'une telle méthode pour purifier SEB, après vérification par SDS Page et immunoblotting. Le désavantage majeur de cette méthodologie réside en l'utilisation d'importants volumes de surnageants de culture (2,5 L).

Parmi les entérotoxines staphylococciques, les travaux de purification ont porté essentiellement sur SEB. Johansson et al. (1990) ont développé une technique composée de trois étapes chromatographiques consécutives : deux basées sur la chromatographie échangeuse d'ions et une filtration sur gel. Tout comme précédemment, le point critique reste la prise d'essai puisque le volume de surnageant de culture utilisé était important (2 L).

Une application aux matrices alimentaires a également été réalisée par la détection de SEB par BIA (Biomolecular interaction analysis) couplé à la spectrométrie de masse décrite par Nedelkov (2003). Des solutions standard et des matrices (champignons en conserve) naturellement contaminées en SEB

ont été utilisées. La limite de détection a été estimée à 1 ng/mL. L'inconvénient de cette méthode est la nécessité d'utilisation de matériel spécifique Biacore (GE Healthcare).

Ainsi ces méthodes utilisant la CLHP se sont révélées intéressantes pour purifier les entérotoxines staphylococciques à partir de surnageants de culture mais ne sont pas appropriées pour purifier en vue d'une détection les entérotoxines staphylococciques à partir d'extraits de matrices alimentaires.

3.2.2.4.3 Nouvelles approches par spectrométrie de masse

Plusieurs équipes (Yasuo et al., 2005 ; Hedstrom et al., 2005 ; Carol et al., 2005) ont développé un système de digestion en ligne afin de séquencer et d'identifier les protéines. Yasuo et al. (2005) ont analysé les toxines protéiques telles que SEB de poids moléculaire de 28,4 kDa, en couplant une chaîne de chromatographie en phase liquide à un spectromètre de masse de type MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption-Ionisation Time-Of-Flight)-SM. De même, Schlosser et al. (2007) ont utilisé ce principe de détection de la SEB dans des surnageants de culture de souches de *S. aureus* ou dans des matrices de type produits laitiers suite à une séparation par billes immunomagnétiques.

D'autres auteurs (Hedstrom et al., 2005 ; Carol et al., 2005) ont développé le même principe utilisant un système en une seule étape pour identifier un mélange de protéines. Dans ce système, les protéines sont séparées, digérées et identifiées dans un délai inférieur à 40 minutes à l'aide d'un système de micro chromatographie liquide (μ LC), chromatographie d'exclusion, chaîne de digestion puis ionisation et identification par ESI-SM-SM. Ces auteurs ont utilisé comme modèle un mélange de protéine A (protéine membranaire des staphylocoques de poids moléculaire proche de celui des entérotoxines staphylococciques qui est de l'ordre de 25 à 30 kDa), de SEB et de cytochrome B.

Cependant, bien que hautement spécifiques, ces méthodes ne permettent pas de quantifier exactement la (ou les) toxine(s) présente(s) dans les échantillons analysés et n'ont donc pas été développées dans le but d'investiguer les TIAC à staphylocoques.

Le développement récent des « sciences omiques » utilisant la spectrométrie de masse pourrait permettre d'étudier la production d'ES en fonction de différents facteurs (environnementaux, nature de la matrice alimentaire...). En effet, les « sciences omiques » visent à mieux comprendre les mécanismes de la biologie sous l'angle des systèmes, en ayant généralement recours à des technologies de pointe et aux avancées des technologies de l'information. Les « sciences omiques » regroupent des champs d'étude de la biologie qui s'intéressent aux interactions dans et entre des

ensembles vivants complexes (espèces, populations, individus, cellules, protéines, ARN, ADN) en prenant compte de l'environnement auquel ces ensembles vivants sont exposés et de l'écosystème dans lequel ils vivent. Parmi ces sciences, la transcriptomique (étude des ARN) et la protéomique (étude des protéines) pourraient apporter de nombreuses réponses sur les facteurs influençant la production d'ES dans les matrices alimentaires.

Ainsi et afin de mieux comprendre à terme les facteurs régissant la production d'ES dans les aliments, nous nous sommes tout d'abord intéressés, au travers de ces travaux, au développement d'une méthode quantitative utilisant la spectrométrie de masse pour investiguer les TIAC par quantification des entérotoxines dans les extraits protéiques complexes .

4. Réglementation sanitaire relative aux staphylocoques et aux toxines

Ces travaux de thèse ont été réalisés au laboratoire d'études et de recherche sur la qualité des aliments et des procédés agroalimentaires de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (AFSSA LERQAP). Pour les staphylocoques et les entérotoxines, ce laboratoire est en charge de deux mandats de référence nationale et communautaire dont une des missions est de vérifier la bonne application par les services déconcentrés de la réglementation en vigueur.

Compte tenu de la nature de ses mandats, le LERQAP est accrédité sous le référentiel EN/ISO CEI 17025 (Anonyme, 2005b) « qualité des essais » pour les méthodes relatives aux SCP et aux entérotoxines staphylococciques. Fort de l'expérience du LERQAP en management de la qualité pour les essais, il a été décidé de conduire les thèses, dont celle ci, sous assurance qualité en recherche.

C'est à ce titre que sont présentés ci-dessous le paquet hygiène et les missions du laboratoire.

4.1 Le paquet hygiène

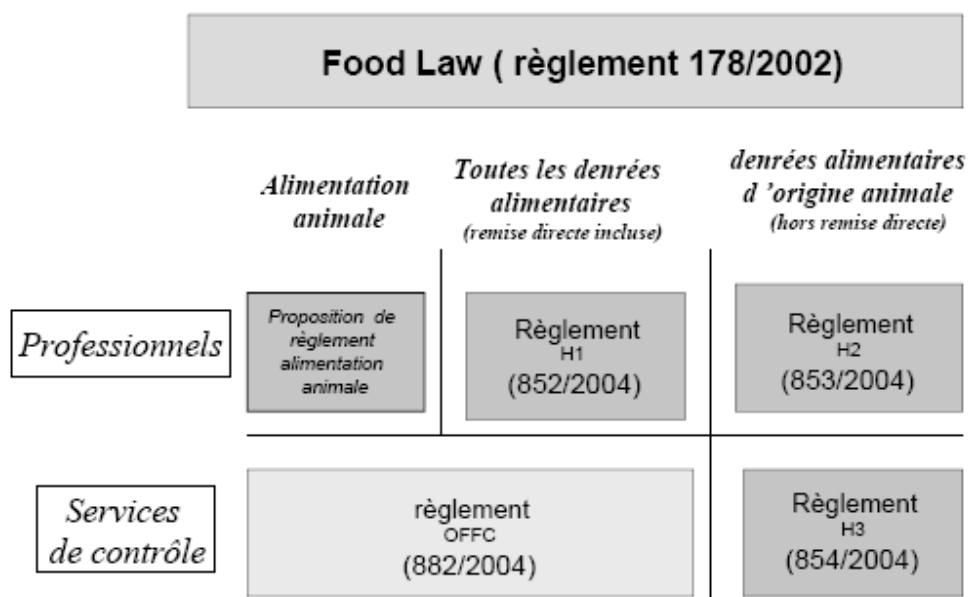
En janvier 2000, la Commission Européenne au travers de son livre blanc a décidé d'une refonte de la réglementation communautaire en matière d'hygiène. Les objectifs de cette refonte étaient les suivants :

- obtenir un niveau élevé de protection de la santé humaine,
- assurer une bonne circulation des denrées alimentaire dans la communauté,
- simplifier les textes pour assurer une meilleure lisibilité et permettre de répondre à toutes les situations (nature, taille des entreprises ...)
- permettre l'évolution technologique tout en assurant la sécurité
- tenir compte des progrès scientifiques.

Cette réflexion a permis la mise en place du paquet hygiène (Figure 15) regroupant des textes communautaires (trois règlements et deux directives) avec pour objectifs :

- une simplification des textes (17 directives sectorielles, une directive horizontale, quatre règlements)
- une mise en place d'une approche intégrée de toute la filière depuis la production primaire jusqu'à la table du consommateur « de la fourche à la fourchette »

Figure 15 : architecture du paquet hygiène (NS/DGAL/SDSSA/N2004-8193 du 28 juillet 2004)



Dans l'objectif de définir les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires, plusieurs groupes de travail ont été constitués dès 2001 par la Direction générale de la santé et de la protection des consommateurs (DG SANCO) sous l'égide du comité vétérinaire permanent. En effet les critères existants dans les différentes directives communautaires alors en vigueur i) n'étaient pas fondés sur une évaluation de risque, ii) ne couvraient qu'un nombre restreint de pathogènes et de matrices alimentaires, iii) n'étaient pas toujours en adéquation avec les problématiques de santé publique, iv) devaient être harmonisés au sein des pays de l'Union Européenne et v) il existait des problèmes sanitaires pour des pathogènes tels que *Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.*, *Listeria spp.*, *E. coli* productrices de vérotoxines sans que des critères n'existent.

Compte tenu de leur implication dans les TIAC et des problèmes de sécurité sanitaire qu'ils posent, les staphylocoques à coagulase positives et les entérotoxines ont été traités au sein du groupe de travail

« Entérotoxines staphylococciques dans les produits laitiers et plus particulièrement les fromages » qui s'est tenu de juillet 2002 à mars 2003 (ec.europa.eu/food/fs/sc/scv/out61_en.pdf).

Les recommandations formulées dans ce rapport adopté les 26 et 27 mars 2003 par le Comité vétérinaire permanent (Anonyme, 2003a) ont été reprises dans le règlement CE N2073/2005 du 15 novembre 2005 (Anonyme, 2005 a).

4.2 Règlements N2073/2005 et N1441/2007 et critères microbiologiques pour les staphylocoques à coagulase positive et les entérotoxines staphylococciques

Suite à ces travaux, une approche globale et harmonisée par germe et non plus par filière a été mise en place au travers du règlement CE N°2073/2005 du 15 novembre 2005 (Anonyme, 2005a), modifié par le règlement CE N1441/2007 du 5 décembre 2007 (Anonyme, 2007c). Dans ce règlement fondé sur l'analyses des risques, ce sont les professionnels qui sont responsables de ce qui est mis sur le marché.

Ce règlement repose sur deux types de critères microbiologiques : les critères d'hygiène des procédés et les critères de sécurité.

Dans le règlement N2073/2005 les staphylocoques à coagulase positive sont classés comme un des critères d'hygiène des procédés dans les matrices type laits et produits laitiers et dans les coquillages et crustacés décoquillés et décortiqués cuits (Tableau 12) alors que les entérotoxines staphylococciques constituent un des critères de sécurité dans les matrices de type laits et produits laitiers (Tableau 13). Compte tenu de l'évolution des méthodologies de détection des entérotoxines staphylococciques ce règlement a été modifié le 5 décembre 2007 en mentionnant comme méthode à mettre en œuvre la méthode validée par le Laboratoire Communautaire de Référence pour les staphylocoques à coagulase positive (LCR SCP).

Tableau 12 : Critère *S. aureus* d'hygiène des procédés

Catégorie d'aliment	Microorganisme	Plan d'échantillonnage		Limites (ufc/g)		Méthode d'analyse de référence	Stade d'application du critère	Action en cas de résultat insatisfaisant
		n	c	m	M			
Fromage au lait cru	SCP	5	2	10 ⁴	10 ⁵	EN/ISO 6888-2	Pendant le procédé de fabrication, au moment où l'on prévoit le nombre de staphylocoques à coagulase positive le plus élevé	Améliorations de l'hygiène de la production et de la sélection des matières premières. Lorsque des valeurs > 10 ⁵ ufc/g sont détectées, le lot de fromages doit faire l'objet d'une recherche des entérotoxines staphylococciques.
Fromages à base de lait ayant subi un traitement thermique moins fort que la pasteurisation (1) et fromages affinés à base de lait ou de lactosérum pasteurisés ou ayant subi un traitement thermique plus fort que la pasteurisation (1)	SCP	5	2	100	1000	EN/ISO 6888-1 ou 2		
Fromages à pâte molle non affinés (fromages frais) à base de lait ou de lactosérum pasteurisés ou ayant subi un traitement thermique plus fort que la pasteurisation (1)	SCP	5	2	10	100	EN/ISO 6888-1 ou 2	Fin du procédé de fabrication	Améliorations de l'hygiène de la production. Lorsque des valeurs > 10 ⁵ ufc/g sont détectées, le lot de fromages doit faire l'objet d'une recherche des entérotoxines staphylococciques.
Lait en poudre et lactosérum en poudre (2)	SCP	5	2	10	100	EN/ISO 6888-1 ou 2	Fin du procédé de fabrication	Amélioration de l'hygiène de production. Lorsque des valeurs > 10 ⁵ ufc/g sont détectées, le lot de fromages doit faire l'objet d'une recherche des entérotoxines staphylococciques.
Produits décortiqués et décoquillés de crustacés et de mollusques cuits	SCP	5	2	100	1000	EN/ISO 6888-1 ou 2	Fin du procédé de fabrication	Améliorations de l'hygiène de production

(1) : À l'exception des fromages pour lesquels le fabricant peut démontrer, à la satisfaction des autorités compétentes, qu'ils ne présentent aucun risque de contamination par entérotoxines staphylococciques

(2) : Ce critère ne s'applique pas aux produits destinés à être encore transformés dans le secteur alimentaire.

Tableau 13 : Critère de sécurité entérotoxines staphylococques

Catégorie d'aliment	Microorganisme, toxines, métabolites	Plan d'échantillonnage		Limites (ufc/g)		Méthode d'analyse de référence	Stade d'application du critère
		n	c	m	M		
Fromages, laits en poudres et lactosérum en poudre (cf tableau 12)	Entérotoxines de staphylocoques de types SEA à SEE	5	0	non détection dans 25 grammes		Hennekinne et al., (2003). <i>JAOAC Int.</i> 86, 2, 332-339.	Produits mis sur le marché pendant leur durée de conservation

4.3 Laboratoires Communautaire et National de référence

4.3.1 Missions

Afin de s'assurer de la mise en place de ces critères au sein des Etats membres, la DG SANCO a nommé 12 Laboratoires Communautaires de Référence (LCR) pour les pathogènes déclinés dans le règlement CE N°2073/2005 « critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires » ; chaque LCR s'appuyant sur un réseau de Laboratoires Nationaux de Référence (LNR) nommés par chacun des Etats membres.

Les principales missions des LCR sont les suivantes :

- développer et valider, le cas échéant, des méthodes pour satisfaire à la réglementation,
- fournir au réseau de LNR qu'il encadre les détails scientifiques et techniques sur les méthodes à mettre en œuvre,
- coordonner l'application de ces méthodes par les LNR par des actions de formation et l'organisation de réunion(s),
- vérifier la compétence du réseau de LNR en organisant des essais interlaboratoires d'aptitude,
- réaliser les analyses de confirmation à la demande des LNR,
- apporter une expertise scientifique à la Commission Européenne.

De leur côté les LNR sont en charge de :

- collaborer avec leur LCR,
- gérer, animer et coordonner les activités du réseau des laboratoires officiels de contrôle de leur pays,
- assurer un relais des informations en provenance du LCR vers le réseau des laboratoires officiels de contrôle
- organiser des essais interlaboratoires d'aptitude,
- réaliser les analyses de confirmation,
- apporter une expertise scientifique à leur autorité compétente

4.3.2 Laboratoire Communautaire et National de Référence pour les Staphylocoques à Coagulase Positive

En date du 23 mai 2006, le règlement EC N°776/2006 (Anonyme, 2006g) a défini la liste des Laboratoires Communautaires de Référence pour les différents critères microbiologiques applicables

aux denrées alimentaires. Le Laboratoire d'Etudes et de Recherches sur la Qualité des Aliments et des Procédés agro-alimentaires (LERQAP) de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (AFSSA) a ainsi été nommé LCR SCP. Depuis cette date, il est en charge d'un réseau de 27 LNR.

De même, au niveau français, le LERQAP a été nommé LNR SCP. A ce titre, il encadre un réseau de 25 laboratoires d'application.

Compte tenu de ses missions, le LCR/LNR peut être confronté à des problèmes non résolus rencontrés par les réseaux qu'il encadre en terme de caractérisation d'épisodes toxiques. Ces problèmes peuvent alors être transformés en projet de recherche dont les retombées seront directement utilisables par les Etats Membres (programme de recherche sous mandat LCR) ou en projets de recherche nécessitant des collaborations avec des organismes de recherche extérieurs à l'AFSSA sur des sujets plus fondamentaux (appels à projets français et /ou européen).

Enjeux et objectifs de la caractérisation des toxi-infections alimentaires collectives à staphylocoques à coagulase positive

La présence de ces entérotoxines dans différents types d'aliments consommés par l'Homme, est susceptible de provoquer des toxi-infections alimentaires collectives. En France, sur la période 1996-2007, ces entérotoxines ont été responsables de la deuxième cause de toxi-infections alimentaires collectives d'origine bactérienne derrière celles dues aux salmonelles. Dans le cas d'une intoxication par entérotoxines staphylococciques, les symptômes caractéristiques de la maladie sont spectaculaires : ils apparaissent très rapidement (30 minutes à 8 heures) après l'ingestion de l'aliment contaminé et se traduisent par des nausées, des vomissements incoercibles, des douleurs abdominales, des diarrhées profuses et une déshydratation parfois sévère peut s'instaurer. Cependant, de nombreuses toxi-infections alimentaires avec symptômes proches d'une intoxication staphylococcique restent non caractérisées et de ce fait non répertoriées compte tenu des limites des outils analytiques.

1. Enjeux et intérêts de la caractérisation des toxi-infections alimentaires collectives

1.1 Enjeux

1.1.1 Enjeux scientifiques

Pendant de nombreuses années, les travaux de caractérisation des toxi-infections alimentaires à staphylocoques ont été axés sur le dénombrement et la caractérisation des souches de SCP en se contentant seulement de rechercher et éventuellement d'étudier les entérotoxines staphylococciques sans mettre en relation ces deux types d'informations. Plus récemment, le développement des outils de biologie moléculaire et l'amélioration des méthodes de détection des entérotoxines ont rapidement mis en évidence des discordances entre le pouvoir toxigène de souches de SCP isolées d'aliments suspectés et la (ou les) toxine(s) retrouvée(s) dans ces aliments. Ainsi, une souche potentiellement productrice des toxines de types SEA et SED n'a produit dans l'aliment impliqué que la toxine de type SEA.

Au début de ces travaux, l'état de l'art sur les SCP et les ES ne permettait pas d'expliquer ces discordances ; Il apparaissait donc urgent de développer des connaissances i) sur la physiologie de *S. aureus* notamment son comportement en matrices alimentaires, ii) sur l'expression et la régulation des gènes codants pour les ES et iii) sur la caractérisation des ES dites anciennes et celles nouvellement

décrites mises en évidence par biologie moléculaire dont rien n'était connu tant au niveau de l'expression qu'au niveau de la prévalence dans les toxi-infections alimentaires collectives.

1.1.2 Enjeux techniques

Les méthodes à disposition lors de début de ces travaux n'étaient pas satisfaisantes et il était parfois difficile d'en interpréter les résultats : en effet bien que plusieurs méthodes soient utilisables pour la recherche du germe et des toxines, aucune des réponses obtenues ne concourait à obtenir une vue d'ensemble pouvant expliquer la survenue de la toxi infection alimentaire collective.

Bien que les méthodes de recherche et de dénombrement des SCP aient été étudiées au travers de différentes actions de normalisation (Anonyme, 1999ab ; 2003b) pour connaître leur domaine d'application et leurs limites, il ressort que parmi les souches de SCP d'origine alimentaire, certaines sont sujettes à variation en perdant leur caractère discriminant (la présence de coagulase) induisant ainsi des biais dans la caractérisation de ces souches et *a fortiori* dans l'investigation des épisodes toxiques.

De plus, la recherche des entérotoxines staphylocoques par méthodes immunochimiques (seul principe analytique utilisable à ce jour) se heurtait à un problème de spécificité des méthodes (réactions croisées avec les composants de la matrice alimentaire induisant des résultats de type faux positifs) provoquant un défaut voire des erreurs de caractérisation. Ainsi, une denrée pouvait elle être déclarée comme contenant des ES alors que ce n'était pas le cas et réciproquement.

Compte tenu de ces observations, il conviendrait alors de résoudre les problèmes analytiques liés aux méthodes utilisées pour améliorer et ainsi augmenter le taux de caractérisation des toxi-infections alimentaires collectives dues aux staphylocoques et à leurs entérotoxines.

1.1.3 Enjeux sanitaires

Au début de nos travaux, près d'un quart des épisodes toxiques restait non élucidé bien que présentant une symptomatologie digestive proche d'une intoxication staphylococcique. Bien que de nombreuses études aient été conduites sur *S. aureus*, les connaissances sur l'implication de ses toxines, notamment celles nouvellement décrites, dans les épisodes toxiques répertoriés, restaient notoirement insuffisantes, ce qui limitait par exemple l'action préventive ou curative à instaurer par les pouvoirs publics pour diminuer de façon sensible l'incidence de ces toxi-infections alimentaires collectives en France. De plus, les données disponibles sur la dose à ingérer pour provoquer les symptômes n'étaient

disponibles qu'au travers de quelques épisodes bien documentés et ne concernaient que la toxine de type SEA.

Ainsi, il conviendrait non seulement d'obtenir des informations sur le type de toxine impliquée et la dose ingérée mais aussi de comprendre les paramètres influençant la croissance du germe et la production de toxine en mettant l'accent sur l'incidence des toxines nouvellement décrites pour réaliser un parallèle avec le profil toxinogène des souches isolées d'épisodes toxiques.

2. Objectifs des travaux

En 2006, lorsque ce travail a débuté, le schéma pour l'élucidation des TIAC à staphylocoques s'articulait autour de la recherche du germe et de la détection de la ou des entérotoxine(s) dans les matrices alimentaires suspectées (Figure 16).

Figure 16 : Analyses à mettre en œuvre pour élucider les épisodes toxiques où *S. aureus* et ses entérotoxines étaient suspectés



Deux problèmes étaient alors à considérer, le premier relatif à la pertinence de l'isolement des staphylocoques, le second relatif aux outils disponibles pour la détection des entérotoxines staphylococciques.

Ce système de caractérisation des épisodes toxiques dus aux entérotoxines staphylococciques présentait d'évidentes lacunes. En effet, dans le cas d'un aliment traité thermiquement, le dénombrement des SCP ne s'avérait que peu ou pas informatif compte tenu du caractère thermosensible de la bactérie. Dans ce cas, la caractérisation de l'épisode toxique ne reposait que sur la détection des entérotoxines staphylococciques de type SEA à SEE. Compte tenu du manque de spécificité de certaines méthodes utilisées et de la description des nouvelles formes d'entérotoxines staphylococciques autres que SEA à SEE dont certaines avec activité émétique prouvée, il semblait difficile de caractériser et d'élucider de nombreux épisodes à symptomatologie staphylococcique.

Enfin, lors des déclarations aux autorités compétentes, les commémoratifs étaient souvent incomplets car il manquait des informations sur le nombre de personnes malades par rapport au nombre de personnes exposées, les symptômes de la maladie et la durée d'incubation. Cette action d'investigation était un pré-requis obligatoire avant toute caractérisation des épisodes toxiques.

Dans ce contexte et compte tenu des éléments énoncés ci dessus, nous avons centré nos travaux sur les outils utilisés pour caractériser les TIAC à SCP et sur la démarche à mettre en œuvre pour élucider ces dernières.

Ces travaux se sont déroulés au sein du laboratoire d'études et de recherches sur l'hygiène des aliments et des procédés agroalimentaires (LERQAP) de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (AFSSA). Ce laboratoire, fort de ses deux mandats de laboratoire national et communautaire de référence pour les SCP et leurs entérotoxines, intervient dans un cadre de surveillance et de contrôle des denrées alimentaires notamment dans le cas de TIAC. C'est pourquoi les outils développés ont directement été utilisés dans un cadre officiel sur des échantillons provenant du terrain que la laboratoire est habilité à analyser en tant que laboratoire de référence.

Compte tenu de ce mandat de référence, les analyses de recherche des entérotoxines staphylococciques ont été réalisées sous accréditation essais COFRAC (accréditation n° 1-0245, portée disponible sur le site www.cofrac.fr). De plus, les travaux de cette thèse ont été conduits sous assurance qualité en recherche (Annexe 1).

Nous avons tout d'abord opté pour l'amélioration des outils de détection pour augmenter la caractérisation des ES. Ces travaux ont été réalisés en collaboration avec l'unité Caractérisation et épidémiologie bactérienne (CEB) du LERQAP.

Comme énoncé précédemment, les méthodes ont été étudiées pour une application dans un cadre réglementaire. C'est pourquoi ces dernières ont fait l'objet d'une validation selon les textes normatifs en vigueur.

Hennekinne J-A., Guillier F., Perelle S., De Buyser M.L., Dragacci S., Lombard B., Krys S. (2007). Intra laboratory validation of the Vidas SET2 detection kit in milk products according to the EN ISO 16 140 standard. *J. Appl. Microbiol.* 102, 1261–1272.

Hennekinne J-A., Ostyn A., Guillier F., Gohier M., Messio S., Dragacci S., Krys S, Lombard B. (2007) Interlaboratory validation of the Vidas SET2 detection kit for an use in official controls of staphylococcal enterotoxins detection in milk products especially low-fat cheeses. *Int J. AOAC*, 90, 3, 756-764.

Nous avons ensuite axé nos travaux sur la caractérisation des souches isolées d'épisodes toxiques tant au niveau des gènes présents qu'au niveau des toxines produites en surnageants de culture. Ces travaux ont été réalisés en collaboration avec les unités Caractérisation et épidémiologie bactérienne (CEB) et Hygiène et microbiologie des produits alimentaires (HMPA) du LERQAP.

Kérouanton A., Hennekinne J-A., Letertre C., Petit L., Chesneau O., Brisabois A., De Buyser M-L (2007). Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. *Int. J. Food Microbiol.* 115, 369-375.

Par la suite, nous avons développé une méthode de confirmation utilisant la spectrométrie de masse quantitative pour quantifier les entérotoxines staphylococciques dans des solutions de référence puis dans des matrices alimentaires modèles afin de disposer d'une méthode de confirmation de principe différent de l'ELISA. Ces travaux ont été réalisés en collaboration avec le laboratoire d'étude dynamique des protéomes (EdyP) du Commissariat à l'énergie atomique (CEA) de Grenoble et l'unité des bactéries lactiques et opportunistes (UBLO) de l'INRA de Jouy en Josas.

Dupuis A., Hennekinne J-A., Garin J., Brun V. (2008). Protein Standard Absolute Quantification (PSAQ) for improved investigation of staphylococcal food poisoning outbreaks. *Proteomics.* 8, 22, 4633-4636.

Enfin, nous avons mis en œuvre l'ensemble de la démarche analytique intégrée du gène à la protéine pour investiguer un cas de TIAC. Ces travaux ont été réalisés en collaboration avec l'unité CEB du LERQAP et avec le laboratoire d'étude dyanmique des protéomes (EdyP) du Commissariat à l'énergie atomique (CEA) de Grenoble.

Hennekinne J-A., Brun V., De Buyser M-L., Dupuis A., Ostyn A., Dragacci S. (2009). Innovative contribution of mass spectrometry to characterise staphylococcal enterotoxins involved in food outbreaks. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 3, 882-884.

Présentation des travaux

1. Amélioration des méthodes de détection des entérotoxines staphylococciques

Lorsque ces travaux ont débuté, une unique méthode officielle pouvait être utilisée comme méthode de recherche des entérotoxines staphylococciques aux niveaux français et européen (Anonyme, 2005).

Cette méthode en deux étapes consistait tout d'abord en une extraction suivie d'une concentration de l'extrait par dialyse : cette méthode, bien que non spécifique des ES, avait été précédemment développée (Macaluso et al., 1998) et caractérisée (Macaluso et Lareyre, 2000) au LERQAP. Ainsi, ses limites avaient elles été identifiées.

La seconde étape consistait en une détection à l'aide d'une unique trousse fondée sur le principe immunochimique ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay), la trousse Transia plate SE (Biocontrol Syst, USA) permettant une détection qualitative des toxines SEA, SEB, SECs, SED et SEE. Dans ce test, des anticorps spécifiques de ces entérotoxines sont greffés au fond d'une plaque de microtitration. L'extrait à doser est ensuite déposé puis un mélange d'anticorps polyclonaux couplés à la peroxydase est fixé sur l'éventuel complexe antigène-anticorps. Un produit coloré issu de la réaction enzymatique de la peroxydase avec son substrat et son chromogène est enfin détecté par lecture à $\lambda = 450$ nm après arrêt de la réaction enzymatique par un acide. Cette méthode ne donnait pas satisfaction compte tenu de son fort taux de résultat faux positif, aussi restait il à améliorer la trousse Transia plate SE et à caractériser les trousse de détection des ES disponibles sur le marché pour en connaître les limites en terme de spécificité, de sensibilité, de robustesse et d'application.

Dans l'objectif d'améliorer les outils de détection, le premier travail a consisté d'une part à améliorer la trousse de détection Transia plate SE et d'autre part, d'évaluer la trousse Vidas SET2 (bioMérieux, France) pour pouvoir la proposer comme méthode de première intention utilisable dans un cadre officiel de recherche des entérotoxines staphylococciques de types SEA à SEE dans le produits laitiers.

Pour répondre à ces interrogations, la spécificité des différents anticorps présents dans les trousse de détection a été testée en utilisant des surnageants de culture de souches de staphylocoques caractérisées au niveau génétique et des matrices alimentaires de type produits laitiers contaminées ou non par des entérotoxines staphylococciques.

Cette évaluation a été conduite selon la norme de validation internationale en vigueur EN/ISO 16 140 (Anonyme, 2003c) et comportait une étude intra laboratoire visant à évaluer la sensibilité, la spécificité et l'exactitude relatives de la méthode et une étude inter laboratoires ayant pour objectif de vérifier sa praticabilité et sa robustesse et sa reconnaissance internationale.

Lors de l'étude intralaboratoire de la trousse Transia plate SE sur matrices de type laits et produits laitiers naturellement contaminées en ES de types SEA à SEE nous avons obtenu 42% de résultats faux positifs.

Ce manque de spécificité pouvait être imputé à plusieurs facteurs : la nature (mono ou polyclonal), l'origine des anticorps (souris, lapin, rat, chèvre...), l'immunogène utilisé et/ou la présence lors du dosage d'interférences co-extraites avec les entérotoxines staphylococciques.

Il est avéré que les anticorps monoclonaux sont plus spécifiques de l'antigène à doser pour lesquels ils ont été développés que les anticorps de type polyclonaux. Ainsi un test utilisant des anticorps de type monoclonal sera plus spécifique qu'un test utilisant des anticorps polyclonaux et générera moins de résultat faussement positif si l'extrait est riche en autres protéines que l'antigène à doser.

Bien que les anticorps monoclonaux soient plus spécifiques que les anticorps polyclonaux, des réactions croisées peuvent avoir lieu. En effet, lors du développement de trousse de détection au milieu des années 1980, seuls les gènes codants pour les ES dites classiques SEA à SEE avaient été décrits. Nous nous sommes donc interrogés sur la spécificité des anticorps développés, à savoir si lors du développement, la (ou les souches) utilisée(s) ne codai(en)t pas pour une autre ES que celle décrite lors de son utilisation, pouvant ainsi entraîner un biais dans la spécificité des anticorps développés.

Ces problèmes de spécificité peuvent être attribués à la découverte récente des nouveaux gènes codants pour les ES : ainsi, une souche utilisée comme référence pour la production de SED (Chang et Bergdoll, 1989) s'avère aussi codante pour les toxines de type SEJ et SER décrites respectivement en 1998 et en 2004. Ainsi, une telle souche peut non seulement posséder la capacité de produire la toxine SED mais aussi les toxines SEJ et SER induisant lors de l'immunisation la production d'anticorps contre tous ces antigènes toxiques synthétisés. A titre d'exemple, Kaffman et Roberts (2006) ont démontré que la souche de référence FRI 100 connue pour sa production de toxine SEA possédait un gène *sed* muté non détectable par PCR classique compte tenu de quatre mutations et de deux délétions. Ce gène est capable de produire une protéine SED tronquée mais réactive aux anticorps anti-SED.

En plus de ces réactions croisées dues à la nature des anticorps, il est avéré que les immunoessais possèdent quelques inconvénients : des réactions non spécifiques ont ainsi été rapportées avec certaines trousse de détection sur différents types de matrices alimentaires ou sur matrices alimentaires contaminées avec d'autres microorganismes que *Staphylococcus spp.* (Park et al., 1992 ; Wu et al., 1992). Comme nous l'avons vu précédemment la majorité des souches de *S. aureus* produit de la protéine A. Cette protéine, a la capacité de se lier sur les fragments Fc des immunoglobulines de type G des espèces souris et lapin, ces types d'immunoglobulines étant très souvent utilisés dans les tests commerciaux comme anticorps de capture et de révélation respectivement. Compte tenu de leurs propriétés physicochimiques, d'autres protéines peuvent être co-extraites avec les entérotoxines

staphylococciques lors de la première l'étape de recherche. Parmi ces dernières les peroxydases et la phosphatase alcaline peuvent générer des réactions faussement positives car elles sont utilisées comme enzyme de révélation dans une grande majorité des trousse immunochimiques commerciales, notamment dans le cas de la trousse Transia plate SE.

Suite au traitement par immunoglobulines de lapin, le taux de résultat faussement positif est passé de 42 % à 8,7 % suggérant d'une part, une possible interactions avec la protéine A présente dans les extraits et d'autre part, le manque de spécificité des anticorps de la trousse Transia plate SE. En effet, cette méthode utilise comme anticorps de capture et de révélation des IgG issus de souris ou de lapin dont la partie constante (Fc) est susceptible d'interagir avec la protéine A présente dans les extraits.

En revanche, la trousse Vidas SET2 utilisant des anticorps modifiés de type Fab' (partie constante Fc éliminée par hydrolyse enzymatique) provenant de l'espèce rat, s'est montrée insensible au pré traitement par IgG de lapin.

Ainsi, l'étude intra laboratoire nous a permis de démontrer que la trousse Vidas SET2 possédait les mêmes paramètres en terme de sensibilité, spécificité et d'exactitude relatives que la trousse de détection Transia plate SE lorsqu'elle est mise en œuvre après une extraction par dialyse. Les résultats obtenus sur matrices alimentaires ont mis en évidence l'importance de l'utilisation du pré traitement aux immunoglobulines de lapin dans le cas de l'utilisation des trousse Transia plate SE.

L'étude inter laboratoires a quant à elle démontré la capacité de la trousse Vidas SET2 à détecter de façon satisfaisante les entérotoxines staphylococciques de types SEA à SEE dans leur domaine d'application réglementaire : les produits laitiers.

Compte tenu des résultats obtenus, ces deux méthodes de détection, Transia plate SE modifiée et Vidas SET2 ont été intégrées d'une part, au niveau national dans une note de service de la Direction Générale de l'Alimentation (Anonyme, 2006f) et d'autre part, au niveau communautaire dans le Règlement CE N°1441/2007 (Anonyme, 2007c) pour la recherche des entérotoxines staphylococciques de types SEA à SEE dans les produits laitiers.

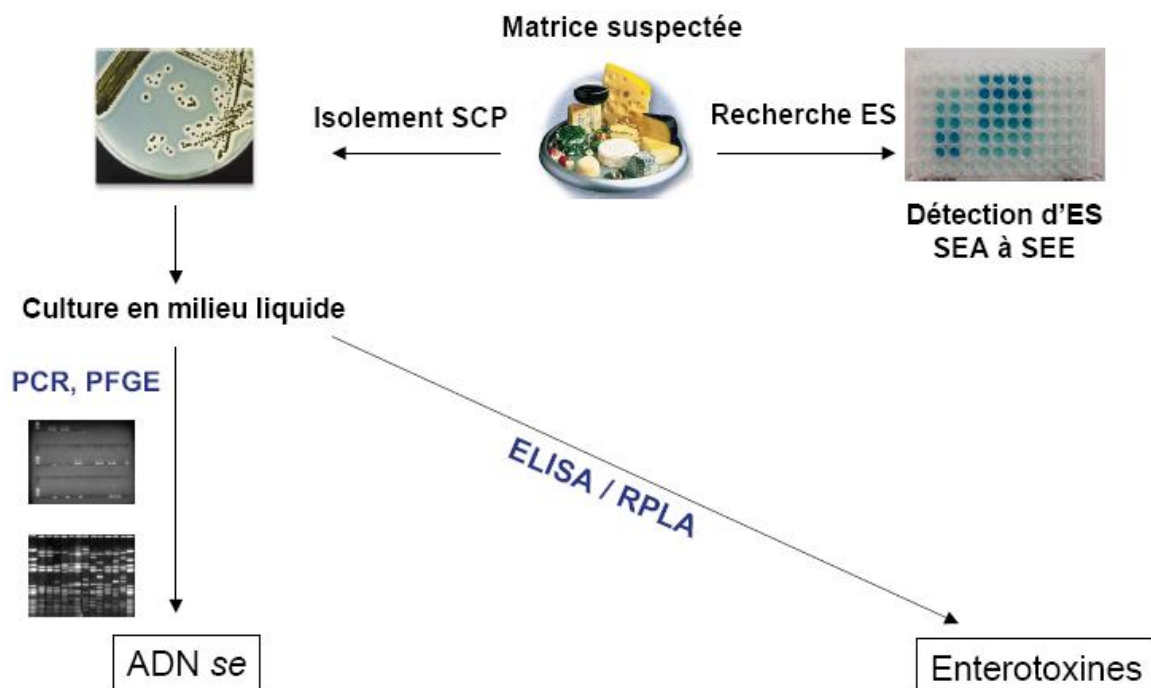
De plus, au niveau national, dans l'objectif d'obtenir des informations communes de la part des laboratoires lors d'envoi d'échantillons, une annexe relative aux renseignements à fournir pour une recherche d'entérotoxines dans un cas de toxi infection alimentaire collective a été intégrée dans la note de service relative à la recherche des entérotoxines staphylococciques de types SEA à SEE dans les produits laitiers. A titre informatif, dans un souci d'homogénéité, le même type de modification a été apporté à la note de service relative à la recherche des entérotoxines staphylococciques de types SEA à SEE dans d'autres matrices que les produits laitiers (Anonyme, 2007a). Enfin, ces deux notes de

services demandent aux laboratoires de faire parvenir au LNR les souches de staphylocoques isolées de la matrice suspectée en vue d'une caractérisation moléculaire.

2. Caractérisation des souches de staphylocoques à coagulase positive

Suite à ces premiers travaux d'amélioration analytique indispensable pour investiguer les toxi-infections alimentaires collectives nous nous sommes intéressés à la caractérisation des souches isolées d'épisodes toxiques. Cette étude a porté non seulement sur la potentiel toxigène des souches isolées (présence de gènes codants pour les entérotoxines staphylococciques) mais aussi sur la capacité d'expression toxinique de ces souches (détection d'entérotoxines staphylococciques en surnageants de culture et en matrices alimentaires) (Figure 17).

Figure 17 : Méthodologie utilisée pour caractériser les souches de *S. aureus* isolées de toxi-infections alimentaires collectives (PCR et PFGE)



2.1 Origine des souches et potentiel toxigène

Comme nous l'avons vu précédemment, la caractérisation des TIAC ne reposait que sur l'isolement des SCP et/ou la détection plus ou moins fiable des entérotoxines staphylococciques. Ces informations parcellaires ne permettaient pas de connaître l'origine de la contamination et *a fortiori* d'empêcher que

l'évènement responsable de la TIAC ne survienne à nouveau. Une des premières étapes a donc consisté en l'étude de l'origine des souches isolées d'épisodes toxiques. Ainsi 178 souches de staphylocoques à coagulase positive correspondant à 31 épisodes toxiques différents collectés et conservés au LERQAP entre 1981 et 2002 au laboratoire ont été analysés.

2.1.1 Etude de l'origine des souches isolées d'épisodes toxiques et génotypage *sea* à *sei*

Staphylococcus aureus peut être classé en biotypes ou habitats préférentiels. Le biotypage tel que décrit par Deviese et al. (1984) et Isigidi et al. (1989) repose sur la recherche de quatre caractères biochimiques : présence d'hémolysine β , de staphylokinase, aspect de la colonie sur milieu au cristal violet et capacité de coaguler le plasma bovin. En fonction des réponses obtenues pour ces quatre caractères, les souches peuvent être classées en quatre biotypes : humain, bovin, ovin - caprin, non spécifique d'hôte. Ces informations peuvent ainsi permettre de connaître l'origine de la souche isolée. Cependant, ces tests souvent difficilement interprétables rendent le diagnostic peu fiable. De plus, aucune corrélation entre le biotype et l'éventuel pouvoir toxinogène ne peut être déduite par l'utilisation de ces méthodes de type biochimique.

Afin de contourner ces inconvénients et dans un souci d'utilisation dans un cadre d'étude épidémiologique, une méthode de macrorestriction de l'ADN suivie d'une électrophorèse (électrophorèse en champs pulsés) a été développée en milieu hospitalier (Ichiyama et al., 1991 ; Prévost et al., 1991) pour classer les souches de *S. aureus* multirésistantes aux antibiotiques impliquées dans les infections nosocomiales dont le déterminisme de la résistance acquise aux antibiotiques est le plus souvent génétique.

Cette méthode de typage de référence a été mise en place au sein de notre laboratoire dès 2003 sur un ensemble de souches de *S. aureus* non multirésistantes de collection (Hennekinne et al., 2003). Cette méthode s'est avérée être une méthode de choix car capable de classer les souches de *S. aureus* en fonction de leur biotype, humain ou animal. Elle a aussi permis de distinguer les différents biotypes animaux sur des clusters différents et de mettre en évidence un biotype « aviaire - abattoir » au sein du biotype non spécifique d'hôte. Cette méthode permettait donc de classer les biotypes de *S. aureus* et était suffisamment discriminante pour différencier les souches multirésistantes aux antibiotiques. Nous nous sommes donc interrogés sur la pertinence d'une telle méthode pour l'étude des gènes codants pour les ES.

Devant l'intérêt de cette méthode, nous l'avons appliquée aux souches de *S. aureus* isolées d'épisodes toxiques pour obtenir des informations sur l'origine de la contamination et sur le pouvoir toxinogène des souches de *S. aureus*. Enfin, dans l'objectif d'étudier les éventuelles relations biotype – génotype, nous

avons soumis les souches isolées à une analyse génétique par PCR conventionnelle pour les gènes de *sea* à *sei* suivant une méthode PCR utilisant les amorces précédemment décrites par Johnson et al. (1991), Straub et al. (1999) et Mac Lauchlin et al. (2000).

Nous avons donc procédé à l'analyse de 178 souches de staphylocoques à coagulase positive correspondant à 31 épisodes toxiques différents.

Lors du biotypage par la méthode classique d'Isigidi et al. (1989) et par celle que nous avons mis en place par électrophorèse en champs pulsés (Hennekinne et al., 2003), nous avons pu mettre en évidence la capacité de cette dernière méthode à classer les souches issus d'épisodes toxiques en fonction de leur biotype. Ainsi, les souches de biotypes animaux et humains se trouvaient sur des clusters séparés. De même, au sein des souches de biotype animal, nous avons pu mettre en évidence que les souches de biotype bovine et ovine/caprine étaient séparés. Enfin, nous avons pu montrer que, sur les souches étudiées, il existait une forte corrélation entre pulsotype et pouvoir toxigène : les souches porteuses des mêmes gènes codants pour les ES se retrouvant sur les mêmes clusters.

Cette étude a permis de conforter le fait que les souches d'origine humaine étaient préférentiellement responsables des épisodes toxiques. En effet, 26 souches de biotype humain ont été impliquées dans les 31 épisodes étudiés (soit 83,8 %). Les souches de biotype non humain ont toutes été isolées de fromages au lait cru, signe d'une contamination du lait comme matière première par des mammites à staphylocoques.

L'étude a également permis de montrer que la toxine de type SEA a été majoritairement retrouvée dans les foyers. Parmi les 33 souches étudiées, 23 portaient le gène codant pour la SEA (69,7 %). Ce résultat est en accord avec le fait que les souches de biotype humain portent préférentiellement les gènes codants pour la SEA. Ce résultat est en accord avec d'autres études conduites sur des souches impliquées dans des épisodes toxiques lors d'un génotypage des gènes de type *sea* à *see* (Shimizu et al., 2000 ; Cha et al., 2006 ; Lawrynowicz-Paciorek et al., 2007). Lors de ces études, les auteurs ont montré que parmi les gènes des ES classiques, le gène codant pour la SEA est majoritairement retrouvé à une fréquence comprise entre 11 et 51 %.

Nous nous sommes aussi intéressés aux gènes codants pour les entérotoxines nouvellement décrites SEG, SEH et SEI. Nous avons pu aussi montrer qu'il existait une association entre les gènes codants pour les toxines de type SEG et SEI. Enfin, sur 32 souches représentatives des 31 épisodes, 25% portaient les gènes *seg* et *sei* et 16 % portaient le gène *seh*.

Les souches de *S. aureus* isolées d'aliments non impliqués dans des épisodes toxiques ont fait l'objet de nombreuses études afin d'obtenir une vision globale de la contamination par *S. aureus* et du danger

toxine associé. En Italie, 100% de 50 souches isolées de lait de vaches atteintes de mammites étaient porteuses de *seg* et *sei* (Zecconi et al., 2006). En Irlande, 64% de 157 souches isolées de réfrigérateurs domestiques étaient porteuses de *seg* et *sei* alors que 7% seulement étaient porteuses des gènes *sea* à *see* (Smyth et al., 2005).

Différents auteurs ont également étudié les souches de *S. aureus* isolées d'épisodes toxiques : Mac Lauchlin et al. (2000) ont étudié en Grande Bretagne 39 souches de SCP isolées de 38 épisodes toxiques. Parmi ces souches, les auteurs ont montré que sur les 39 souches, 32 (82 %) portaient un des gènes *sea* à *sei*. Enfin, parmi les 32 souches positives pour les gènes *sea* à *sei*, 17 possédaient un des gènes codants pour les toxines de type SEG, SEH et/ou SEI (53,2 %).

En France, Rosec et al. (2002) ont recherché les gènes codants non seulement pour les ES dites classiques (SEA à SEE) mais aussi les gènes codants pour les entérotoxines nouvellement décrites (SEG à SEI) afin d'évaluer la prévalence de ces gènes dans 332 souches isolées d'épisodes toxiques français. Il ressort de cette étude que les souches comportant des gènes codants pour ces nouvelles entérotoxines s'élève à 57 % ce qui est beaucoup plus élevé que la fréquence des gènes codants pour les ES dites classiques (Rosec et al., 1997). Ce travail a aussi démontré que dans les souches étudiées les gènes codants pour les toxines de type SEG et SEI étaient souvent associés.

Au Japon, Omoe et al. (2002) ont montré que 16,9 % des souches isolées codaient pour les gènes *seg* et *sei* et qu'une association pouvait avoir lieu avec le gène *seb* dans 2,8 % des cas.

A Taïwan, Chen et al. (2004) ont montré que les gènes *seg*, *seh* et *sei* étaient présents à une fréquence de 9,4 %, seuls ou en association avec le gène *sea* (10,0 %). Comme dans les études précédentes ils ont mis en évidence une possible association avec les gènes codants pour les ES classiques. Quelques années plus tard, Chiang et al. (2006) ont montré que le gène *sei* était présent dans 30,6 % des souches isolées d'épisodes toxiques.

La méthode PCR permet de démontrer l'existence de gènes *se* dans les souches mais elle ne permet pas de déterminer si l'entérotoxine correspondante est effectivement produite. Omoe et al. (2002) ont pu montrer à l'aide de leurs propres réactifs que les souches porteuses du gène *seh* produisaient des quantités importantes de SEH dans un bouillon de culture, mais que la plupart des souches porteuses des gènes *seg* et *sei* produisaient des quantités très faibles de SEG et SEI. L'implication de SEH a été démontrée par la mise en évidence de cette entérotoxine dans des aliments responsables de TIAC, une fois seule dans une purée (Jorgensen et al., 2005) et une fois en association avec l'entérotoxine A dans du lait (Ikeda et al., 2005) et de l'entérotoxine D dans du fromage (Pereira et al., 1996). L'implication de SEG et SEI est plus discutable. Seule la mise en évidence de ces toxines dans l'aliment suspect permettra de démontrer leur responsabilité dans une TIA.

Cette première étude nous a permis de dresser un bilan des gènes *sea* à *sei* codants pour les ES, de mettre en évidence le pouvoir discriminant de l'électrophorèse en champs pulsés et de montrer l'intérêt d'une telle approche pour la caractérisation génétique des souches isolées d'épisodes toxiques. De plus, comme d'autres études le suggéraient le gène codant pour la toxine de type SEA a été retrouvé majoritairement dans les souches isolées de toxi-infections alimentaires collectives.

Enfin, cette étude a montré la prévalence (de 9,4 à 53,2 % en fonction des études) au sein des souches de TIAC étudiées des gènes *seg*, *seh* et *sei* codants pour les toxines correspondantes à activité émétique prouvée. Aussi il semble difficile de conclure sur l'implication des gènes codants pour les toxines de type SEG, SEH et SEI ; certains auteurs leur attribuant une responsabilité dans le cas des TIAC à SCP (Mac Lauchlin et al., 2000), d'autres considérant que ce type de toxine ne jouerait qu'un rôle mineur dans les TIAC (Chen et al., 2004).

2.1.2 Génotypage *sej* à *seu*

Afin de compléter cette étude de prévalence et d'obtenir une vue d'ensemble de tous les gènes codants pour les ES décrits dans la littérature, nous avons poursuivi le génotypage des gènes *sej* à *seu* dans les souches de *S. aureus* isolées de matrices suspectées ou incriminées dans les TIAC caractérisées précédemment et dans des souches de référence afin de valider les amorces utilisées. En effet, peu d'études ont recherché les autres gènes codants pour les nouvelles entérotoxines staphylococciques (SEL, SEM, SEN, SEO, SEP, SEQ, SER et SEU).

Lors de nos travaux, les gènes codants pour les ES de type SES et SET (Ono et al., 2008) n'avaient pas encore été décrits, les PCR relatives à ces derniers n'ont donc pas été réalisées. Ceci est d'autant plus dommageable que parmi tous ces nouveaux gènes, les produits des gènes *ses* et *set* possèdent une activité émétique lors de leur administration chez le singe. L'activité émétique des autres produits de ces gènes (à l'exception de SER) n'a quant à elle pas encore été testée.

Pour réaliser le génotypage, l'ADN total des souches a été extrait à l'aide du kit InstaGene™ Matrix (Bio-Rad) selon les recommandations du fournisseur après mise en culture de quelques colonies bactériennes en milieu BHI. Les amorces utilisées (Tableau 14) pour réaliser le génotypage ont été déduites des alignements de séquences publiées des gènes codants pour les ES et achetées chez Sigma genosys (Evry, France).

Tableau 14 : Amorces utilisées pour les réactions de PCR des gènes *sej* à *seu*

Amorces	Séquence (5'-3')	Taille attendue
SEJ for	CTGCATGAAAACAATCAACTTTATG	<i>sej</i>
SEJ rev	GAACAACAGTTCTGATGCTATC	79 pb
SEK for	GTCACAGCTACTAACGAATATC	<i>sek</i>
SEK rev	TAGTGCCGTTATGTCCATAAATG	193 pb
SEL for	TAGATTCGCCAAGAATAATACC	<i>sel</i>
SEL rev	CTTTACCAAGTATCATTGTGTCC	176 pb
SEM for	TCATATCGCAACCGCTGATGATG	<i>sem</i>
SEM rev	TCAGCWGTTACTGTGCAATTAT	150 pb
SEN for	GATGAAGAGARAGTTATAGGCGT	<i>sen</i>
SEN rev	ATGTTACCGGTATCTTTATTGTAT	167 pb
SEO for	GTGTAAGAAGTCAAGTGTAGAC	<i>seo</i>
SEO rev	CAGCAGATWTTCCATCTAACC	163 pb
SEP for	GGAGCTAGACCTTCAGTCAAGA	<i>sep</i>
SEP rev	ACCAGAAGAAGGGTGAACTCA	115 pb
SEQ for	GGAATTACGTTGGCGAATCAA	<i>seq</i>
SEQ rev	TGATATCCATATTCCTGACC	221 pb
SER for	TCCTATTCCTTATTCAGAATACA	<i>ser</i>
SER rev	GGGTATTCCAAACACATCTAAC	102 pb
SEU for	AATGGCTCTAAAATTGATGGTTC	<i>seu</i>
SEU rev	GTTTGTCCCAAACAATCTAYG	105 pb

Les réactions PCR ont été réalisées dans un thermocycleur GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems). Les milieux réactionnels contenaient 2,5 U d'enzyme FastStart Taq DNA polymerase (Roche Diagnostics), 1X tampon sans MgCl₂, 4 mM de MgCl₂, 100 µM de chaque dNTP, 0,6 µM de chaque amorce et 2 µL d'ADN à amplifier dans un volume réactionnel total de 50 µL.

Suite à la réaction PCR, 5 µL de chaque amplifiat a été analysé sur gel d'agarose 2% (w/v) en tampon TBE 1X puis coloré au bromure d'éthidium. Le marqueur VI (Roche diagnostics) a été utilisé comme marqueur de poids moléculaire.

Notre étude, conduite à partir de souches de *S. aureus* isolées d'épisodes toxiques, a montré que les gènes les plus fréquemment rencontrés étaient ceux codants pour les entérotoxines présentes dans le cluster *egc* : *seg*, *sei*, *sem*, *sen*, *seo* comme suggéré par Jarraud et al. (2001).

Les résultats que nous avons obtenus sur les souches de référence se sont révélés en accord avec ceux présentés par d'autres auteurs (Blaiotta et al., 2004 ; Lawrynowicz-Paciorek et al., 2007 ; Pocsfalvi et al., 2008) suggérant que les couples d'amorces utilisées pour effectuer les réactions de PCR conventionnelle étaient bien spécifiques des gènes recherchés. De plus, nous avons pu mettre en

évidence des associations entre les gènes *sed*, *sej* et *ser* (résultat conforté par le fait que ces trois gènes sont portés par le même plasmide), *seq* et *sek* ainsi que *sel* et *sec*.

Ainsi, parmi les 19 souches isolées d'épisodes toxiques, 13 (68,4 %) portaient un ou plusieurs gènes codants pour les ES récemment décrites (Tableau 15).

Tableau 15 : Résultats du génotypage *sea* à *seu* des souches de *S. aureus*

Souche	Origine	Résultat PCR (<i>sea</i> à <i>seu</i>)
395 F	Salade composée	<i>sea</i>
359 F	Chou à la crème	<i>sea</i>
361 F	Fromage au lait cru	<i>sea, sed, sej, ser</i>
371 F	Gâteau au chocolat	<i>sea, sed, sej, ser</i>
437 G	Rillettes	<i>sea, seh, seq-sek</i>
295 E	Nougatine	<i>sea, seh, seq-sek</i>
334 E	Spaghettis	<i>sea, seo, sem, sei, sen, seg</i>
339 E	Fromage au lait de brebis	<i>seb, seo, sem, sei, sen, seg</i>
374 F	Fromage	<i>seb, seo, sem, sei, sen, seg</i>
428 G	Aliment non précisé	<i>sel, sec</i>
377 F	Salade composée	<i>sel, sec, sep</i>
383 F	Salade de riz	<i>sel, sec, seh, seo, sem, sei, seu, sen, seg</i>
399 F	Emincé de porc	<i>sed, sej, ser, sep, seo, sem, sei, sen, seg</i>
425 G	Fromage au lait cru	<i>seo, sem, sei, sen, seg</i>
382 F	Aliment non précisé	<i>seh, seo, sem, sei, seu, sen, seg</i>
379 F	Lasagnes	<i>seh</i>
FRI S6	Crevettes congelées	<i>sea, seb, seq-sek</i>
Mu 50	Pus (infection)	<i>sel, sec, sea, seo, sem, sei, sen, seg</i>
FRI 1230	Non précisé	<i>sel, sec, sep, seq-sek</i>
FRI 361	Non précisé	<i>sel, sec, sed, sej, ser, seo, sem, sei, sen, seg</i>
FRI 137	Abcès (ATCC19095)	<i>sel, sec, seh, seo, sem, sei, seu, sen, seg</i>
FRI 1151	Non précisé	<i>sed, sej, ser</i>
FRI 326	Non précisé	<i>see, seq</i>
FRI 569	Non précisé	<i>seh</i>
A900322	Patient atteint d'un choc toxique	<i>sep, seo, sem, sei, sen, seg</i>
CIM 441	Fromage	<i>sec, sel, seg, sem, sei, sen, seo</i>
CIM 479	Fromage	<i>seb, seg, sem, sei, sen, seo</i>
CIM 433	Fromage	<i>sed, sej, ser</i>

Différents auteurs (Bania et al. (2006), Chiang et al. (2006, 2008), Hwang et al. (2007), Lawrynowicz-Paciorek et al. (2007) et Poli et al. (2007)) ont recherché ces gènes dans des souches isolées de matrices alimentaires, mais seuls Chiang et al. (2006, 2008) l'ont fait à partir de souches isolées d'épisodes toxiques. Lors de ces deux études conduites à Taiwan, les auteurs ont montré que 135 des

147 souches testées (91,8 %) portaient au moins un gène codant pour les ES. Ainsi les gènes *sep* (27,9 %), *sek* (16,3 %), *seo* (14,3 %), *seu* (14,2 %), *sem* (11,6 %), *sen* (10,9 %), *seq* (10,9 %), *sel* (6,8 %) et *ser* (5,4 %) ont été retrouvés préférentiellement.

Compte tenu du faible volume d'informations obtenus sur ces gènes en matrices alimentaires issues d'épisodes toxiques, il nous semblait important de dresser un état des lieux de la fréquence de ces nouveaux gènes dans les matrices alimentaires contaminées par des SCP mais non impliquées dans des épisodes toxiques.

Dans leur étude réalisée en Pologne sur 50 souches isolées de produits carnés, Bania et al. (2006) ont montré que les souches possédant *seg* et *sei* possédaient aussi *sem*, *sen* et *seo*. Les gènes *sek* et *seq* puis *sel* ont été détectés dans une puis deux souches respectivement. Huit souches portaient *sep*. Enfin, *sel* a été trouvé en association avec *sec*.

L'année suivante, Hwang et al. (2007) ont étudié les fréquences de ces nouveaux gènes sur 143 souches de SCP isolées de viande de porc et de volaille coréenne. Les gènes les plus fréquemment rencontrés étaient *sem* et *sen* en association avec *seg* et *sei*. Ainsi la combinaison *seg*, *sei*, *sem*, *sen*, et *seo* ou *seu* a fréquemment été retrouvée suggérant l'appartenance de ces gènes au cluster *egc*.

La même année en Pologne, Lawrynowicz-Paciorek et al. (2007) ont recherché la fréquence de ces gènes dans 71 souches isolées de matrices alimentaires. Ces auteurs sont arrivés à des remarques similaires à celles formulées par Hwang et al. (2007) en classant les cinq souches codantes pour *seg*, *sei*, *sem*, *sen* et *seo* comme appartenant à un variant du cluster *egc* (*egc1*) et les huit codantes pour *seg*, *sei*, *sem*, *sen*, *seo*, *seu* comme appartenant à *egc2*. Ils ont également mis en évidence des associations entre les gènes classiques et les cluster *egc1* et *egc2*.

Enfin, Poli et al. (2007) ont étudié 37 souches de SCP isolées de fromage type Monte Veronese. Les gènes *ser*, *sed*, *seg* et *sem* furent les plus fréquemment détectés dans les souches issues de fromages. De plus, dans 66 % des souches, les auteurs ont mis en évidence au moins un des gènes du cluster *egc*. Quatre souches possédaient le plasmide pIB485 et les gènes associés à ce dernier (*sed*, *sej*, *ser*) alors que quatre autres ne possédaient pas le gène *sej*. Enfin, deux souches possédaient les combinaisons *seg*, *seh*, *sep* et *seg*, deux autres *seh*, *sel*, *sem*, *sep*, et *ser*.

Il ressort de ces différentes études que les gènes *seg*, *sei*, *sem*, *sen* et *seo* appartiennent à l'*egc1*, que la présence de *seu* au sein de l'*egc1* correspond à l'*egc2* et que l'association des gènes *seu* et *sev* à l'*egc1* correspond à l'*egc3*.

2.2 Production d'entérotoxines staphylococciques en surnageants de culture et en matrices alimentaires par les souches de *S. aureus* isolées d'épisodes toxiques

Dans un premier temps, il s'agissait de vérifier si les souches porteuses des gènes codants pour les ES étaient capables de production en conditions optimales de culture pour vérifier une éventuelle corrélation entre présence du gène et production de la toxine associée.

Pour évaluer la spécificité des tests immunologiques disponibles pour la détection des entérotoxines de types SEA à SEE, les souches de *S. aureus* précédemment génotypées ont été réisolées sur milieu gélosé PCA + lait et incubées 24 heures à 37°C.

Une öse de chaque boîte a ensuite été transférée dans 10 mL de milieu liquide BHI puis incubées à 37°C pendant une nuit sous agitation. Après centrifugation et filtration sur filtre 0,22 µm, le surnageant de culture a été soumis à une détection des entérotoxines staphylococciques par les différentes méthodes immunochimiques disponibles (SET RPLA, Oxoid ; Transia plate SE, biocontrol Syst ; Vidas SET2, bioMérieux ; test ELISA AFSSA). Le test semi quantitatif SET RPLA (Oxoid) a été utilisé pour rechercher les toxines de type SEA à SED. Les tests qualitatifs Transia plate SE (Biocontrol Syst) et Vidas SET2 (bioMérieux) ont été utilisés pour rechercher les toxines de types SEA à SEE. Enfin, afin d'obtenir des informations de type quantitative pour les toxines de type SEA à SED, le test ELISA développé à l'AFSSA a été utilisé.

Les pourcentages de concordance ont été calculés entre les méthodes PCR et de type immunochimiques pour les toxines de type SEA à SED. En effet, compte tenu de l'absence de souche de SCP porteuse du gène codant pour la toxine de type SEE, il n'a pas été possible d'intégrer cette toxine dans les calculs.

Le pourcentage de concordance entre le génotypage par PCR et la méthode SET RPLA a été trouvé égal à 100% suggérant d'une part, la production des toxines par les souches sous les conditions de cultures utilisées et d'autre part, une excellente spécificité des anticorps de la trousse de détection. Ce fait est en accord avec plusieurs études (Loncarevic et al., 2005, Klotz et al., 2003 ; Letertre et al., 2003) suggérant ainsi que le test SET RPLA est un outil performant pour détecter les entérotoxines classiques (SEA à SED) dans les surnageants de culture de SCP.

En revanche lors de l'étude comparative PCR, outils immunochimique autre que RPLA, le pourcentage de concordance a été trouvé égal à 97,8 ; 91,3 et 76,1 % pour la comparaison PCR / Vidas SET2, Transia plate SE et test AFSSA respectivement. Lors de l'étude des surnageants de cultures par la

méthode quantitative AFSSA, 12 résultats faussement positifs ont été mis en évidence. Ainsi, lors de cette étude nous avons ainsi démontré que les anticorps utilisés étaient capables de réactions croisées.

Dans un second temps, nous avons recherché en matrices alimentaires impliquées dans des TIAC les ES de types SEA à SEE à l'aide des trousse immunochimiques à disposition.

Lors de l'étude réalisée sur les 31 épisodes toxiques reçus au laboratoire entre 1981 et 2002, 24 des épisodes toxiques sur les 31 étudiés (77,5 %) ont pu être caractérisés. Dans ces derniers, la symptomatologie, le nombre de staphylocoques, la caractérisation moléculaire (*sea* à *sei*) et la toxine retrouvée dans l'aliment étaient en accord suggérant que la souche isolée avait bien été responsable de l'épisode toxique. Pour les sept épisodes partiellement résolus (22,5 %) où la symptomatologie et le nombre de SCP isolés laissaient croire à une toxico-infection alimentaire due à une ingestion d'entérotoxines, plusieurs cas de figure ont été rencontrés :

Dans un cas, le profil génétique des souches isolées ne correspondait pas à la toxine retrouvée dans l'aliment laissant penser que les souches n'étaient pas celles incriminées.

Dans trois cas, ni les toxines classiques (SEA à SEE), ni les gènes *sea* à *sei* n'ont été détectés alors que la symptomatologie et le nombre de SCP isolés pouvaient laisser croire à une TIAC à SCP. Dans ces cas, une autre toxine que les toxines SEA à SEI aurait pu être impliquée. Cependant compte tenu des limites des méthodes utilisées, il ne nous pas été possible d'identifier un autre type toxique. Dans deux autres cas, les méthodes utilisées pour détecter les toxines dans les matrices alimentaires n'ont pas permis de donner un résultat suffisamment fiable pour affirmer la présence d'un type toxique donné.

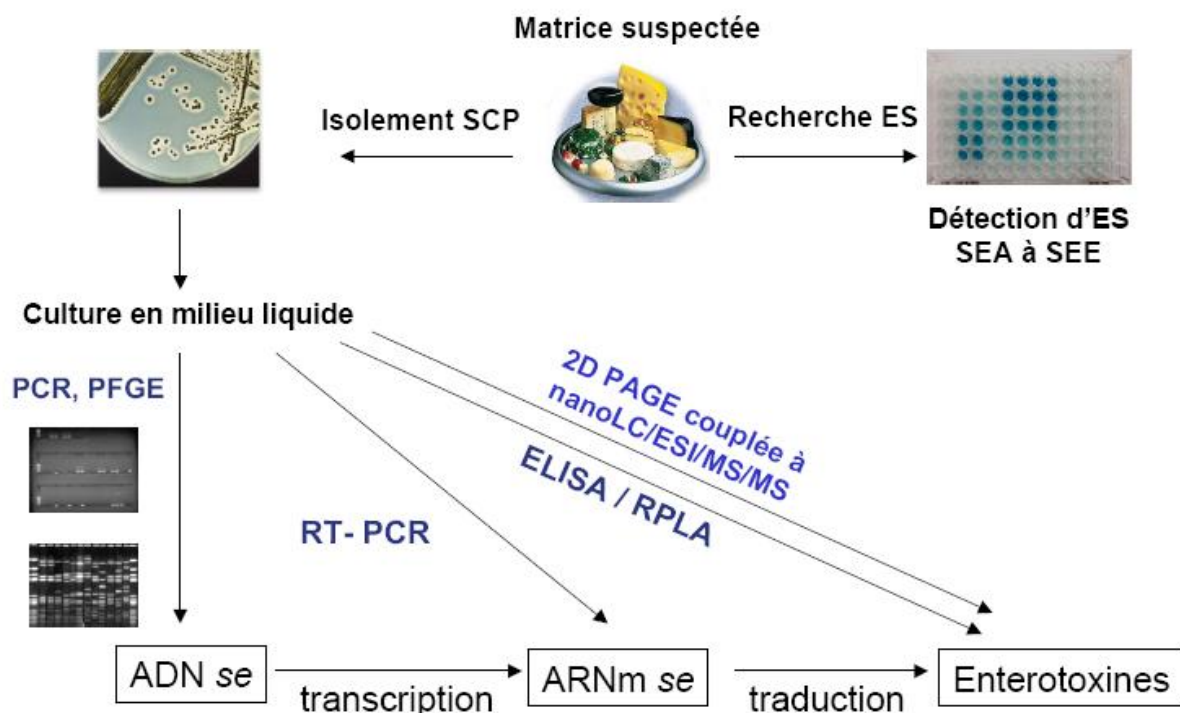
Enfin dans un dernier cas, la toxine retrouvée dans la matrice alimentaire n'était pas en accord avec le profil de virulence de la souche.

Ces résultats mettaient une fois de plus en avant la nécessité de développer des méthodes fiables couvrant l'ensemble des toxines décrites à ce jour pour caractériser les épisodes toxiques.

Enfin, dans un dernier temps, compte tenu des limites de reconnaissance des tests immunochimiques nous avons mis en place une méthode utilisant l'électrophorèse bi-dimensionnelle comme méthode de séparation couplée à une détection par la spectrométrie de masse (Garfin, 2003). En effet, compte tenu des masses moléculaires des ES compris entre 22 et 29 Kda, une électrophorèse classique de type SDS PAGE n'aurait pas été assez résolutive pour discriminer les différents types d'ES, c'est pourquoi nous avons eu recours à une électrophorèse bi-dimensionnelle utilisant le principe d'une première séparation en fonction du point isoélectrique (électrophorèse de type isoélectrofocalisation ou IEF)

couplée à une seconde en fonction de la masse moléculaire des protéines (électrophorèse SDS PAGE). L'objectif était d'une part, de vérifier si l'électrophorèse bi dimensionnelle permettait de séparer les différents types d'ES et d'autre part, d'obtenir, par spectrométrie de masse, des informations sur les entérotoxines exprimées lors de conditions de culture données (Figure 18). A notre connaissance, seuls Nakano et al. (2002) et Pocsfalvi et al. (2008) ont utilisé ce type d'approche pour étudier le sécrétome de différentes souches de *S. aureus* multiresistantes aux antibiotiques.

Figure 18 : Méthodologie utilisée pour caractériser les souches de *S. aureus* isolées de toxi-infections alimentaires collectives (Immunochimie et 2D – MS)



Parmi les souches de *S. aureus* précédemment génotypées (*sea* à *seu*), 11 souches couvrant l'ensemble de ces gènes, dont 3 souches de collection ont été ré-isolées sur milieu gélosé PCA + lait et incubées 24 heures à 37°. Une öse de chaque boîte a ensuite été transférée dans 10 mL de milieu liquide BHI puis incubées à 37°C pendant une nuit sous agitation.

Après centrifugation et filtration sur filtre 0,22 µm, 1 mL de surnageant de culture a été soumis à une extraction des protéines du surnageant soit par un kit commercial (2D clean up, GE Healthcare) soit par précipitation à l'acide acétique (TCA) suivant les modes opératoires rédigés au laboratoire (Annexe 2).

Une quantification des protéines a été réalisée à l'aide du kit 2-D Quant (GE Healthcare) avant dépôt de l'échantillon et séparation par électrophorèse.

Nous avons réalisé l'électrophorèse bi-dimensionnelle, découpé les spots protéiques de point isoélectrique et de masse moléculaire attendus puis envoyé ces spots pour digestion trypsique et identification par spectrométrie de masse au Laboratoire d'étude de la dynamique des protéomes du Commissariat à l'énergie atomique de Grenoble (EdyP, CEA Grenoble).

Après analyse, nous avons reçu l'identification par le logiciel MassLynx (Waters) des protéines contenues dans chaque spot.

Les résultats détaillés de toutes les protéines identifiées sont présentés en annexe 3. Le tableau 16 ci dessous synthétise les résultats obtenus pour l'identification des spots correspondants aux entérotoxines staphylococciques.

Tableau 16 : Résultats de l'électrophorèse 2D-MS sur les surnageants de souches de *S. aureus*

Souche	Génotype (sea à seu)	Résultat 2D-MS
352 E	sec, seg, sei	SEC
359 F	sea	SEA
371 F	sea, sed, sej, ser	SEA
339 E	seb, seg, sei, sem, sen, seo	SEB
428 G	sec, sel	SEC
383 F	sec, seg, seh, sei, sel, sem, sen, seo, seu	SEH
379 F	seh	SEH
374 F	seb, seo, sem, sei, sen, seg	ES non détectées
FRI S6	sea, seb, sek, seq	SEB
FRI 1230	sec, sek, sel, sep, seq	SEC
FRI 137	sec, seg, seh, sei, sel, sem, sen, seo, seu	SEC

Il ressort de cette étude que l'électrophorèse bi dimensionnelle est une méthode pertinente pour séparer les entérotoxines staphylococciques des autres protéines produites par *S. aureus* (protéines de ménage et autres facteurs de virulence). Lors de notre étude, seules les ES de type SEA, SEB, SEC et SEH ont pu être identifiées par spectrométrie de masse. Ce fait pourrait être dû aux conditions de culture utilisées car comme nous l'avons vu précédemment l'expression dans le temps des différentes ES est soumise à plusieurs systèmes de régulation.

Lors de leur étude par électrophorèse bi-dimensionnelle couplée à la spectrométrie de masse, Nakano et al. (1991) ont mis en évidence que les souches de *S. aureus* multirésistantes aux antibiotiques

pouvaient produire un grand nombre de facteurs de virulence et cette méthodologie pouvait être utilisée pour typer les souches. En effet les informations apportées démontrent la virulence des souches au travers de l'expression des protéines et non plus seulement, comme c'est le cas avec l'électrophorèse en champ pulsé, une relation phylogénétique entre souches multirésistantes.

Très récemment, Pocsalvi et al. (2008) ont analysé à l'aide de cette méthodologie les génomes de différentes souches de référence multirésistantes aux antibiotiques pour évaluer leur virulence. Ces auteurs ont pu démontrer que les entérotoxines SEIK, SEIL, SEIP et SEIQ étaient produites mais qu'aucune entérotoxine de l'opéron *egc* (SEG, SEI, SEIM, SEIN et SEIO) n'avait été détectée sous les conditions de culture utilisées. Ainsi, pour ces auteurs, l'analyse du sécrétome par l'outil protéomique apporte des données permettant de comprendre l'expression des protéines de ménage et des facteurs de virulence de *S. aureus* dans des conditions expérimentales données.

3. Caractérisation et quantification de l'entérotoxine staphylococcique de type SEA par spectrométrie de masse

Ces dernières années, la spectrométrie de masse s'est imposée comme la technique incontournable pour l'analyse des protéines (Ong et Mann, 2005). Cependant, comme nous l'avons vu précédemment les données générées restaient essentiellement qualitatives. Certes, quelques équipes ont essayé d'extraire des données quantitatives à partir des données qualitatives obtenues en partant du postulat que le score d'identification était plus élevé lorsque la molécule recherchée était présente à une forte concentration. Cette méthodologie ne s'est pas avérée pertinente car les algorithmes de recherche utilisés par les banques de données recherchent les scores obtenus correspondant au nombre d'identifications et non pas à l'intensité du signal (Steen et Mann, 2004). Pour pallier cet inconvénient, Ishihama et al. (2005) ont utilisé le principe d'indice d'abondance protéique (PAIs). Ce principe se fonde sur le fait que l'identification d'une protéine augmente selon une relation logarithmique avec le nombre de peptides identifiés ; ainsi, plus ce nombre est élevé, plus la protéine est présente en abondance dans l'échantillon testé. Cependant, tous les peptides ne sont pas analysables par spectrométrie de masse : certains sont trop petits, trop grands ou encore ne sont pas correctement retenus par la chromatographie pré analytique. Enfin, les éventuelles pertes lors des étapes de préparation de l'échantillon ne sont pas prises en compte et ne permettent pas à la méthodologie PAIs de quantifier de façon absolue la protéine d'intérêt. Un des objectifs a alors consisté à développer des méthodes de type quantitative absolue pour pouvoir évaluer la teneur en protéines d'un échantillon. Les premières études quantitatives ont utilisé l'introduction d'isotopes lourds stables (^{13}C et/ou ^{15}N) dans un

marqueur de la molécule à doser : des quantités connues de la forme isotopiquement marquée de la molécule recherchée ont été ajoutées à l'échantillon et comparée à la forme native. Un ratio entre les formes lourde (marquée) et légère (native) peut alors être calculé permettant ainsi d'obtenir l'abondance relative de chacun des composés. Les protocoles d'incorporation des isotopes alourdis étaient de deux types : incorporation biologique dans un milieu de croissance ou marquage par voie chimique (Ong et al., 2003). Cependant les faibles reproductibilités et spécificités des marquages sont rapidement apparues comme des inconvénients de ces méthodologies.

Suivant le principe de la dilution isotopique développée par Aebersold et Mann (2003), une quantification exacte d'un composé peut être obtenue en spectrométrie de masse en ajoutant dans l'échantillon à analyser une quantité connue d'un étalon interne chimiquement identique au composé à doser, mais alourdi par l'incorporation d'isotopes stables. Ainsi, deux méthodes de quantification exacte utilisant des peptides marqués (^{13}C et/ou ^{15}N) comme étalons internes ont été publiées : les stratégies AQUA (Absolute quantification) et QconCAT (concatemers of standard peptides for absolute quantification).

Dans la stratégie AQUA, Gerber et al. (2003) ont synthétisé par incorporation d'isotopes stables les peptides de deux protéines de levure mimant les peptides de ces mêmes protéines obtenus par protéolyse. Ces peptides marqués ont ensuite été ajoutés à l'extrait à doser puis soumis à une analyse par spectrométrie de masse quantitative. Cette stratégie a été utilisée avec succès pour quantifier des neuropeptides issu de tissu cérébral humain (Wei et al., 2006).

Dans la stratégie QconCAT, Beynon et al. (2005) ont construit un gène artificiel codant pour les peptides tryptiques de plusieurs protéines musculaires du poulet. Une fois ajoutés à l'échantillon à doser, ces peptides ont subi, au même titre que les protéines présentes dans l'échantillon, une digestion tryptique puis ont été soumis à une analyse par spectrométrie de masse en vue de leur quantification. Cette stratégie a été utilisée avec succès dans d'autres études (Pratt et al., 2006 ; Rivers et al., 2007).

Compte tenu des résultats obtenus, Brun et al. (2007) ont appliqué ces méthodes aux entérotoxines staphylococciques de type SEA et TSST1 dans de l'eau et de l'urine. Parallèlement, ils ont développé une autre méthodologie de quantification utilisant des peptides standards marqués (PSAQ, protein standard absolute quantification). Cette méthode utilise comme étalons internes des protéines recombinantes entières (PSAQ : Protein Standard Absolute Quantification) biochimiquement identiques aux protéines naturelles à doser. Les gènes correspondant aux toxines d'intérêt ont été clonés dans un vecteur puis les étalons PSAQ ont été synthétisés en système acellulaire par incorporation de [$^{13}\text{C}_6$, $^{15}\text{N}_2$] L-lysine et [$^{13}\text{C}_6$, $^{15}\text{N}_4$] L-arginine, permettant ainsi d'obtenir une toxine hautement purifiée marquée isotopiquement, de structure identique à la toxine d'intérêt.

Brun et al. (2007) ont ainsi démontré que cette méthodologie possédait plusieurs avantages par rapport aux techniques AQUA et QconCAT. Bien que ces deux approches soient intéressantes car mimant les propriétés chromatographiques de la toxine cible, elles possèdent quelques inconvénients. La technologie AQUA utilise la synthèse chimique de peptides et s'avère donc très onéreuse à mettre en œuvre. Dans ces deux techniques les peptides marqueurs AQUA et QconCAT sont généralement ajoutés à la fin du processus analytique pouvant ainsi biaiser les résultats obtenus car les rendements des étapes telles que la purification des toxines ou la digestion trypsique ne sont pas prises en compte. Les étalons internes PSAQ, se comportant comme leurs «contre-parties» naturelles, peuvent être ajoutés préalablement à tout traitement de l'échantillon, ce qui permet d'éviter tout biais dû au processus analytique. La technique PSAQ est de fait la seule qui prenne en compte les rendements des étapes de pré-fractionnement, de décomplexification et de digestion trypsique

Lors de la comparaison entre les trois méthodologies, les auteurs ont ainsi pu démontrer que les deux technologies AQUA et QconCAT sous-estimaient la concentration de toxine réellement présente dans l'échantillon. Enfin, la technologie PSAQ possède l'avantage de pouvoir rechercher plusieurs peptides tryptiques spécifiques de la toxine à doser au sein d'un même échantillon, rendant ainsi les mesures plus fiables.

3.1 Quantification d'une solution commerciale d'entérotoxine staphylococcique de type A (SEA) par spectrométrie de masse

Compte tenu des résultats prometteurs de la méthodologie PSAQ, nous nous sommes rapprochés du laboratoire EdyP du CEA de Grenoble pour collaborer et mettre en œuvre cette méthodologie afin de quantifier de façon absolue la solution d'entérotoxine staphylococcique de type SEA commerciale (Toxin Technology, USA) utilisée au laboratoire pour réaliser les gammes d'étalonnage de l'ELISA quantitatif.

Une solution étalon de 1 mg de SEA lyophilisée (TT, lot 120794A) a été préparée dans 1 mL d'eau osmosée afin d'obtenir sur concentration finale théorique de 1 mg/mL.

2,5 ng de toxine SEA et de PSAQ ont été mis à digérer par de la trypsine porcine modifiée (Promega) pendant une nuit à 37°C après activation pendant 10 minutes dans la glace.

Les peptides digérés ont ensuite été évaporés puis le culot a été repris dans 50 µL d'acide formique 0,2% / acétonitrile 5%.

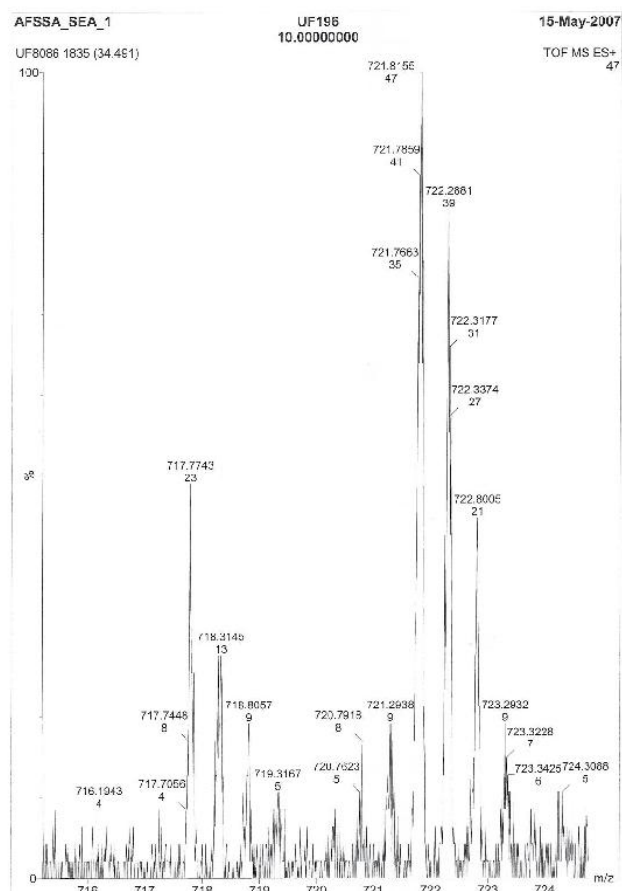
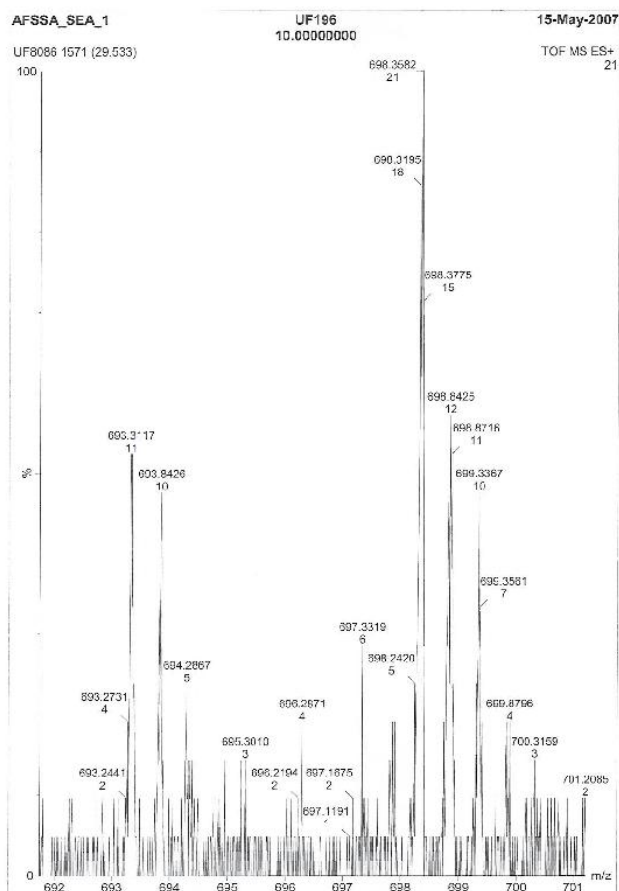
6,4 µL ont été injectés au travers d'une nanoLC/ESI/QTOF ultima (Waters) utilisant une colonne C₁₈ LC packing (Dionex).

Deux PSAQ (NVTVQELDLQAR et YNLYNSDVFDGK) ont été utilisés pour réaliser la quantification de la solution commerciale de SEA.

Les figures 19 et 20 présentent les chromatogrammes obtenus pour la quantification de la solution commerciale de SEA à l'aide des PSAQ NVTVQELDLQAR et YNLYNSDVFDGK respectivement.

Figure 19 : chromatogramme obtenu pour le peptide NVTVQELDLQAR

Figure 20 : chromatogramme obtenu pour le peptide YNLYNSDVFDGK



L'abondance du PSAQ NVTVQELDLQAR ($m/z = 698,4$) a été trouvée égale à 21 tandis que celle de son homologue natif ($m/z = 693,3$) était égale à 11. Nous avons donc introduit $(11/21) * 2,5$ soit 1,31 ng de SEA native au lieu des 2,5 ng théorique.

De la même façon, l'abondance du PSAQ YNLYNSDVFDGK ($m/z = 721,8$) a été trouvée égale à 47 tandis que celle de son homologue natif ($m/z = 717,8$) était égale à 23. Nous avons donc introduit $(23/47) * 2,5$ soit 1,22 ng de SEA native au lieu des 2,5 ng théorique.

Ainsi nous avons pu déduire que la concentration de SEA de la solution commerciale était égale 0,507 mg/mL au lieu de 1 mg/mL comme annoncé par le fabricant. Cette valeur a donc été utilisée par la suite pour construire les gammes étalons de l'ELISA quantitatif au sein du LERQAP et déduire les valeurs en SEA dans les matrices alimentaires étudiées.

3.2 Quantification de l'entérotoxine staphylococcique de type A (SEA) par spectrométrie de masse dans une matrice alimentaire fromagère modèle

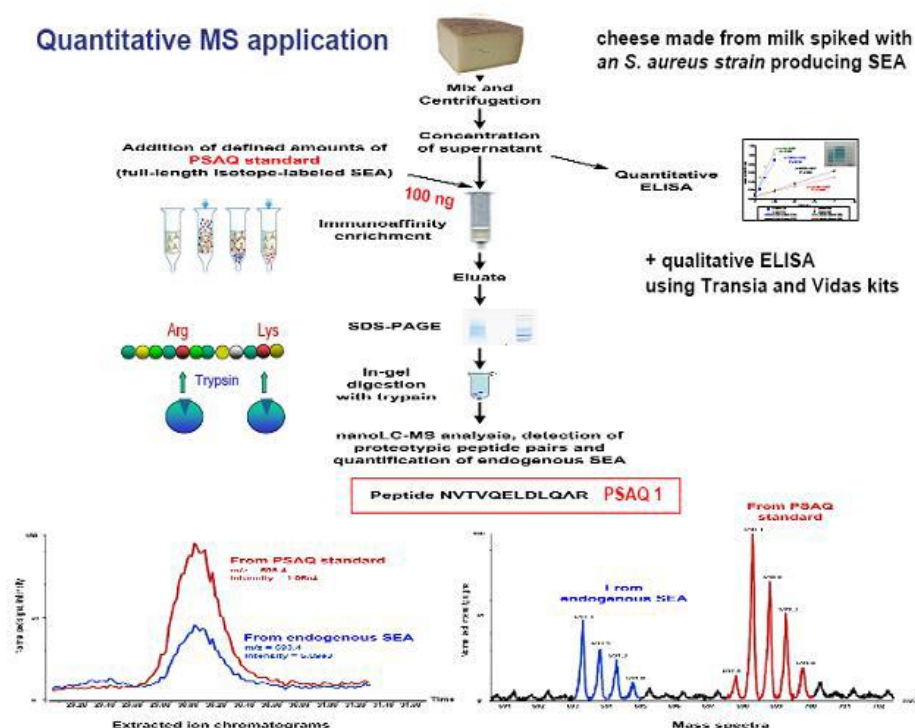
Nous avons voulu vérifier la possible utilisation de la spectrométrie de masse quantitative sur un échantillon de fromage contenant de l'entérotoxine staphylococcique de type SEA.

Ce fromage a été fabriqué par acidification chimique utilisant la δ -gluconolactone (GDL) dans la fromagerie expérimentale de l'Unité des bactéries lactiques et opportunistes (UBLO) de l'Institut national de recherches agronomiques (INRA) de Jouy en Josas à partir de laitensemencé à l'aide de la souche de *S. aureus* 361 F précédemment caractérisée (*sea*, *sed*, *sej*, *ser*).

Un dénombrement de SCP selon la norme NF EN ISO 6888- 2 (Anonyme, 1999b), une recherche globale des ES de type SEA à SEE et une quantification des entérotoxines staphylococciques de type SEA et SED par l'ELISA quantitatif disponible à l'AFSSA ont également été réalisés.

Parallèlement, une partie aliquote de l'extrait fromager concentré par dialyse a été supplémentée avec 100 ng de PSAQ spécifique de la SEA (Brun et al. 2007), purifié sur colonne d'immunoaffinité anti SEA à SEE (Biocontrol Syst, USA), digéré par de la trypsine puis soumis à analyse par spectrométrie de masse en considérant le peptide NVTVQELDLQAR spécifique de la SEA pour réaliser la quantification (Figure 21).

Figure 21 : schéma analytique appliqué à l'échantillon de fromage modèle



Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 17.

Tableau 17 : Résultats obtenus pour le génotypage de souches, la détection et la quantification de la toxine SEA par ELISA et méthode PSAQ dans une matrice fromagère modèle

Aliment	Informations générales	Typage ADN PCR	Dépistage ELISA qualitatif	Confirmation ELISA quantitatif SEA (SED)	Quantification PSAQ SEA
Fromage	Souche 361F 3.10 ⁸ ufc/g	<i>sea, sed, sej, ser</i>	Détection SEA à SEE dans 25 g	2,9 ± 0,3 ng/g * (SED = 4,6 ng/g)	2,5 ± 0,2 ng/g **

* n = 3

** estimation de la teneur en peptide NVTVQELDLQAR (n = 3)

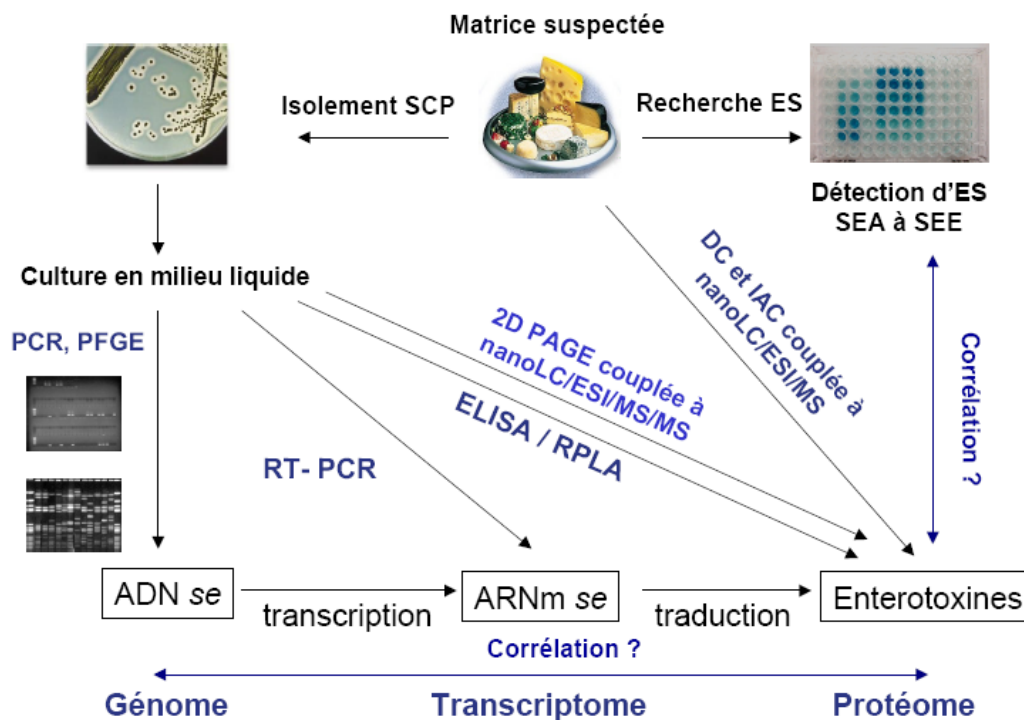
Cette étude a montré d'une part la capacité de la souche 361 F, de biotype humain mais isolée à partir d'un fromage au lait cru de brebis, à croître et à produire des entérotoxines de types SEA et SED dans un fromage au lait de vache. Les résultats obtenus après extraction par dialyse concentration puis détection par les méthodes qualitatives Transia Plate SE et Vidas SET2 ont été positifs. Ces résultats ont été confirmés par la méthode quantitative développée à l'AFSSA et des concentrations en toxines de types SEA et SED ont pu être calculées.

De plus, il ressort de cette étude que la méthodologie PSAQ pour quantifier la toxine de type SEA s'est avérée pertinente et que les résultats des dosages par spectrométrie de masse ont été trouvés similaires à ceux obtenus par ELISA quantitatif. Cette méthodologie semblait donc intéressante à mettre en place pour réaliser une quantification absolue de la toxine de type SEA dans les matrices alimentaires.

4. Mise en œuvre d'une démarche intégrée pour caractériser une toxi infection alimentaire collective

Afin de vérifier la pertinence de l'approche intégrée (Figure 22) regroupant d'une part une analyse microbiologique couplée à une analyse génétique des souches isolées et, d'autre part l'utilisation des outils ELISA et de spectrométrie de masse, nous avons soumis à analyse des matrices alimentaires complexes (« perle de coco »¹) impliquées lors de quatre foyers de TIAC survenus en Ile de France en juillet 2006. Ces foyers ont touché 14 personnes dont 11 ont souffert de vomissements et de diarrhées deux à sept heures après ingestion des aliments contaminés.

Figure 22 : Démarche intégrée utilisée pour caractériser les TIAC à staphylocoques



¹ Dessert chinois

Chaque échantillon « perle de coco » a été soumis à un dénombrement des SCP, à un pulsotypage pour connaître leur origine et l'éventuel lien épidémiologique, à un génotypage par PCR *sea* à *sej* des souches isolées, à une RT PCR pour évaluer la présence d'ARNm, à la recherche des entérotoxines staphylococciques de type SEA à SEE puis à une quantification des entérotoxines staphylococciques de type SEA et SED par l'ELISA quantitatif disponible à l'AFSSA.

Enfin, de la même façon que pour l'échantillon de fromage, 100 ng de PSAQ spécifique de la SEA ont été ajoutés à une des échantillons impliqués dans un des quatre foyers de TIAC ; l'extrait a ensuite été purifié sur colonne d'immunoaffinité, digéré par de la trypsine puis soumis à analyse par spectrométrie de masse considérant deux peptides spécifiques de la toxine SEA (NVTVQELDLQAR et YNLYNSDVFDGK) pour réaliser la quantification.

Plus de 10^6 ufc de SCP/g ont été isolés de chacun des échantillons soumis à analyse. L'analyse par PCR 23S rRNA a démontré l'appartenance des souches isolées à l'espèce *S. aureus*. De plus l'analyse par électrophorèse en champs pulsés a démontré que les différentes souches étudiées possédaient le même profil quelle que soit leur origine alimentaire suggérant une même souche impliquée dans les quatre foyers. Enfin l'analyse par PCR a mis en évidence les gènes de type *sea*, *sed* et *sej* et l'analyse par RT-PCR a démontré la production d'ARNm pour les trois gènes considérés. L'analyse des surnageant de culture a quant à elle mis en évidence la production de toxine de type SEA et SED, fait confirmé par l'analyse par essai ELISA quantitatif où des teneurs de 100 et 500 ng/mL de toxines SEA et SED respectivement ont été mises en évidence.

L'analyse par ELISA quantitatif des « perles de coco » a quant à elle permis de mettre en évidence la présence de toxines de type SEA et SED à des teneurs comprises entre 1,3 et 6,7 ng/g pour la SEA et entre 2,4 et 8,2 ng/g pour la SED. Enfin, l'analyse par spectrométrie de masse quantitative pour le SEA sur un des échantillons a mis en évidence des teneurs de l'ordre de 1,5 ng/g.

Les résultats obtenus à l'aide des différents outils énumérés ci dessus pour un des échantillons sont présentés tableau 18.

Tableau 18 : Résultats obtenus pour le génotypage de souches, la détection et la quantification de la toxine SEA par ELISA et méthode PSAQ dans la matrice perle de coco

Aliment	Informations générales	Typage ADN PCR sea à sej	Dépistage ELISA qualitatif	Confirmation ELISA quantitatif SEA (SED)	Quantification PSAQ SEA
Perle de coco	TIAC 5.10 ⁸ ufc/g	<i>sea, sed, sej</i>	Détection SEA à SEE dans 25 g	1,3 ± 0,2 ng/g * (SED = 4,3 ng/g)	1,5 ± 0,1 ng/g **

* n = 3

** estimation moyenne de la teneur en peptides NVTVQELDLQAR et YNLYNSDVFDGK (n = 3)

Il ressort de ces études que l'approche intégrée permet d'obtenir les informations nécessaires à la caractérisation et à l'élucidation de la TIAC. En effet, l'électrophorèse en champs pulsés nous a permis de démontrer qu'une unique souche avait été à l'origine de cet épisode toxique. Des mesures correctives ont ainsi pu être prises au sein de l'atelier de fabrication des perles de coco pour éviter que l'incident ne se reproduise.

Les résultats des analyses génétiques (ADN et ARNm) ont été trouvés en accord avec ceux obtenus par ELISA lors de l'étude des surnageants de culture et des extraits alimentaires pour les toxines dites classiques (SEA à SEE).

De plus, en considérant la masse moyenne d'une perle de coco (75 g), nous avons pu estimer que la dose ingérée en toxine de type SEA se situait aux alentours de 100 ng, dose minimale proposée dans la littérature pour induire les premiers symptômes chez les sujets les plus sensibles (Evenson et al., 1998 ; Asao et al., 2003 ; Ikeda et al., 2005).

Enfin, cette étude a également démontré que la méthodologie PSAQ pour quantifier la toxine de type SEA, toxine la plus souvent incriminée dans les TIAC à SCP, s'est avérée pertinente dans les matrices alimentaires complexes et que les résultats des dosages par spectrométrie de masse étaient similaires à ceux obtenus par ELISA quantitatif.

Si ce type de résultat était vérifié pour la toxine de type SED, chaque perle de coco renfermerait en plus de la toxine de type SEA, une teneur comprise entre 150 et 750 ng de SED. Ainsi, pour chaque perle de coco, la dose ingérée en toxine de type SEA et SED pourrait être évaluée entre 250 et 850 ng de toxines.

Conclusion et perspectives

Lorsque ce travail a été entrepris en 2006, les staphylocoques à coagulase positive représentaient la première cause de toxi-infections alimentaires d'origine bactérienne avec 18,8 % des foyers (contre 17,7 % pour les salmonelles). Ce rang a été maintenu en 2007 où ce pathogène a été impliqué dans 16,2 % des foyers (contre 14,8 % pour les salmonelles).

Cependant, parmi les foyers déclarés, seule une faible proportion (26 et 23 % pour les années 2006 et 2007 respectivement) correspondait à des foyers confirmés où la présence du germe, la présence de toxine et la symptomatologie laissaient à penser que des staphylocoques à coagulase positive producteurs d'entérotoxines avaient pu être impliqués.

Dans l'objectif d'accroître la caractérisation des épisodes toxiques où les staphylocoques étaient suspectés, nous nous sommes intéressés aux staphylocoques à coagulase positive mais aussi aux entérotoxines qu'ils étaient capables de produire et aux méthodes pour les détecter.

Il convenait donc d'une part, d'améliorer la démarche analytique à mettre en œuvre pour caractériser les toxi-infections alimentaires à staphylocoques et d'autre part, de collecter et d'étudier les informations pertinentes relatives à la symptomatologie et à la durée d'incubation en vue de concourir à l'élucidation des épisodes toxiques.

Nous avons tout d'abord travaillé sur l'amélioration des méthodes de détection des entérotoxines staphylococciques utilisées en première intention dans un cadre réglementaire. En effet, ces dernières présentaient de graves lacunes en terme de spécificité et pouvaient conduire à des résultats faussement positifs ou faussement négatifs. Ces actions ont été entreprises au travers de la validation internationale de deux méthodes de détection des entérotoxines staphylococciques et de la diffusion de ces dernières aux niveaux français et européen. Ainsi, avec l'introduction d'une étape de pré traitement permettant de s'affranchir des interférences dues à la protéine A de *Staphylococcus aureus*, le pourcentage de résultats faux positif de la trousse Transia Plate SE est passé de 42 à 8 %. Enfin, ces études ont mis en évidence la capacité de détection de la trousse Vidas SET2, utilisable depuis cette validation par les laboratoires d'analyse tant au niveau français qu'au niveau européen.

Nous avons ensuite axé nos travaux sur la caractérisation des souches isolées d'épisodes toxiques tant au niveau des gènes présents qu'au niveau des toxines produites en surnageants de culture et en matrices alimentaires impliquées dans des TIAC.

Ces travaux ont conforté le fait que les souches de *Staphylococcus aureus* d'origine humaine étaient préférentiellement retrouvées dans les aliments impliqués dans les épisodes toxiques. Nous avons aussi pu confirmer que la toxine de type SEA était la toxine majoritairement retrouvée dans les toxi-infections alimentaires collectives en France. De plus, l'étude du potentiel entérotoxigénique des souches a mis en évidence la prévalence des gènes *seg*, *seh* et *sei* dans les souches isolées d'épisodes toxiques français. Afin d'étudier la production de ces protéines, l'électrophorèse bi-dimensionnelle couplée à une détection par spectrométrie de masse a été utilisée pour la première fois sur un panel de souches d'origine alimentaire couvrant les gènes décrits dans la littérature (à l'exception des gènes *ses*, *set* et *sev*). Seules les entérotoxines SEA à SED et SEH ont pu être mises en évidence à l'aide de cet outil dans les conditions de culture utilisée. Cette étude a également permis de démontrer que de nombreux facteurs de virulence de *S. aureus* généralement mis en évidence dans les infections humaines comme les leucocidines de Panton Valentine, la phospholipase ou les hémolyses étaient également produites par des souches isolées d'aliments.

Puis, car nous ne disposions pas toujours de souches de *S. aureus* isolées d'épisodes toxiques, nous avons travaillé sur la détection des entérotoxines de staphylocoques à partir de la matrice alimentaire. Pour ce faire, et compte tenu des limites des tests immunologiques en terme de spécificité et de disponibilité des anticorps, nous avons développé une méthode de confirmation de principe différent utilisant la spectrométrie de masse quantitative pour identifier et quantifier les entérotoxines staphylococciques dans les matrices alimentaires. Cette nouvelle approche complémentaire et différente de l'ELISA nous a ainsi permis d'identifier sans ambiguïté et de quantifier l'entérotoxine staphylococcique de type A. Après utilisation de cette méthode pour quantifier une solution commerciale de SEA, nous avons démontré sa spécificité et son pouvoir de quantification absolue au travers d'essais réalisés sur matrice fromagère modèle. Ainsi nous avons pu mettre en évidence que les concentrations de toxines retrouvées à l'aide de cette méthode étaient similaires à celles obtenues par la méthode de référence utilisant l'ELISA.

Enfin, nous avons mis en place une démarche intégrée « du gène à la protéine » au travers de l'élucidation d'une TIAC à SCP impliquant des matrices alimentaires complexes. Cette démarche intégrant à la fois les outils conventionnels de microbiologie, de biologie moléculaire (PFGE, PCR et RT PCR), les méthodes de type immunologiques par ELISA et la méthode innovante de spectrométrie de masse quantitative nous a permis de démontrer l'intérêt d'une telle approche pour caractériser et élucider les TIAC à SCP.

Comme nous l'avons évoqué précédemment seules les données épidémiologiques d'épisodes toxiques où la toxine de type SEA était impliquée sont actuellement exploitables. Bien que représentant la cause majoritaire des TIAC à SCP, la littérature nous montre que cette toxine n'est pas la seule impliquée. Dans l'optique d'accroître la caractérisation et l'élucidation des TIAC à SCP, il conviendrait, dans un premier temps, d'étudier au travers de modèles animaux, après obtention d'entérotoxines staphylococciques purifiées, les doses émétiques 50 des différentes entérotoxines staphylococciques pour connaître leur pouvoir émétique et ainsi obtenir une caractérisation du danger entérotoxine staphylococcique. Dans un second temps, une fois cette dernière établie, des outils tels que celui développé dans ces travaux pourrait être mis en œuvre pour disposer d'une méthode multiplexe de dosage des entérotoxines staphylococciques représentant un réel risque sanitaire. Cet outil nous permettrait de contribuer à l'évaluation des risques en quantifiant de manière absolue les concentrations présentes et de les relier à la dose ingérée lors de TIAC.

Enfin, il conviendrait de poursuivre d'une part, les travaux de caractérisation des souches isolées d'épisodes toxiques en intégrant la recherche et l'expression des gènes nouvellement mis en évidence (*ses* et *set*) par techniques de biologie moléculaire et d'autre part, de mettre en place des travaux pour comprendre et élucider les mécanismes d'expression et de régulation de la production des entérotoxines staphylococciques dans les matrices alimentaires et ainsi d'élucider les TIAC à SCP atypiques.

Listes de travaux

Publication nationale à comité de lecture :

1. Hennekinne J-A. (2009). Croissance de *S. aureus* et production d'entérotoxines : du bon respect de la chaîne du froid pour éviter les épisodes toxiques alimentaires. *Revue générale du froid et du conditionnement d'air*, 1090, 57-61.

Publications internationales à comité de lecture :

2. Hennekinne J-A., Brun V., De Buyser M-L., Dupuis A., Ostyn A., Dragacci S. (2009). Innovative contribution of mass spectrometry to characterise staphylococcal enterotoxins involved in food outbreaks. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 3, 882-884.
3. Dupuis A., Hennekinne J-A., Garin J., Brun V. (2008). Protein Standard Absolute Quantification (PSAQ) for improved investigation of staphylococcal food poisoning outbreaks. *Proteomics.* 8, 22, 4633-4636.
4. Kérouanton A., Hennekinne J-A., Letertre C., Petit L., Chesneau O., Brisabois A., De Buyser M-L (2007). Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. *Int. J. Food Microbiol.* 115, 369-375.
5. Hennekinne J-A., Guillier F., Perelle S., De Buyser M.L., Dragacci S., Lombard B., Krys S. (2007). Intra laboratory validation of the Vidas SET2 detection kit in milk products according to the EN ISO 16 140 standard. *J. Appl. Microbiol.* 102, 1261–1272.
6. Hennekinne J-A., Ostyn A., Guillier F., Gohier M., Messio S., Dragacci S., Krys S, Lombard B. (2007) Interlaboratory validation of the Vidas SET2 detection kit for an use in official controls of staphylococcal enterotoxins detection in milk products especially low-fat cheeses. *Int J. AOAC*, 90, 3, 756-764.

Communications orales :

Hennekinne J-A., Brun V, Deperrois V, Dragacci S., De Buyser M-L. (2008) First use of quantitative mass spectrometry for staphylococcal enterotoxin A detection in cheese. Food micro. 8 - 14 sept., Aberdeen (Ecosse).

Dupuis A., Jaquinod M, Hennekinne J-A., Adrait A, Lebert D, Garin J, Brun V. (2008) PSAQ strategy for accurate and sensitive quantification of biomarkers in biological fluids and food. From genome to proteome : integration and proteome completion. 31 août - 4 sept., Sienne (Italie).

Hennekinne J-A. (2006) Détection des entérotoxines staphylococciques dans les matrices alimentaires. 11th conference on food microbiology. 14 – 15 sept., Gand (Belgique).

Affiches :

Hennekinne J-A., Dragacci S., Ostyn A., Lombard B. (2008) Staphylococcal food poisoning outbreaks in Europe : occurrence, monitoring and investigation. ISSSI 08, 3 - 10 sept., Cairns (Australie).

Brun V, Jaquinod M, Dupuis A, Lange V, Hennekinne J-A., Adrait A, Lebert D, Garin J. (2008). PSAQ strategy for sensitive and accurate quantification of biomarkers in serum and food. 2nd EuPA conference - 7th HUPO world congress, 16 – 20 août, Amsterdam (Pays-Bas).

De Buyser M-L., Kérouanton A., Hennekinne J-A., Letertre C., Petit L., Chesneau O., Brisabois A. (2006). Molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. ISSSI 06, 1 - 3 sept., Maastrich (Pays Bas).

Publications

1. Hennekinne J-A. (2009). Croissance de *S. aureus* et production d'entérotoxines : du bon respect de la chaîne du froid pour éviter les épisodes toxiques alimentaires. *Revue générale du froid et du conditionnement d'air*, 1090, 57-61.

DOSSIER | FROID ET SÉCURITÉ ALIMENTAIRE |

> Croissance de *S. aureus* et production d'entérotoxines : du bon respect de la chaîne du froid pour éviter les épisodes toxiques alimentaires

par Jacques Antoine Hennekine*

Après un premier chapitre consacré à l'analyse scientifique des staphylocoques et entérotoxines, cet article s'attache à expliquer ce que sont les toxi-infections alimentaires collective (TIAC) à staphylocoques, la symptomatologie associée et leur incidence en France via un exemple concret. Un sujet qui nous concerne tous.

Staphylocoques et entérotoxines staphylococciques

Le genre *Staphylococcus* appartient au phylum des Firmicutes (bactéries à Gram positif), à la classe des Bacilli et à l'ordre des Bacillales. Outre les *Staphylococcus* sp., la famille bactérienne des *Staphylococcaceae* comprend quatre autres genres moins connus, *Gemella*, *Jeotgalicoccus*, *Macrococcus* et *Salinicoccus*. A ce jour, cinquante espèces et sous-espèces ont été identifiées au sein du genre *Staphylococcus*. Les espèces sont généralement classées en deux groupes sur la base de leur capacité à produire une coagulase libre : les staphylocoques à coagulase positive (SCP), généralement considérés comme pathogènes et les staphylocoques à coagulase négative (SCN), réputés moins dangereux. Dans cet article nous ne traiterons que de l'impact de *Staphylococcus aureus* en sécurité sanitaire des aliments.

Parmi les SCP, plusieurs espèces peuvent sécréter des entérotoxines staphylococciques (ES), c'est le cas de *Staphylococcus aureus* (espèce majoritairement retrouvée dans les épisodes toxiques) et de *Staphylococcus intermedius* dont une souche fut

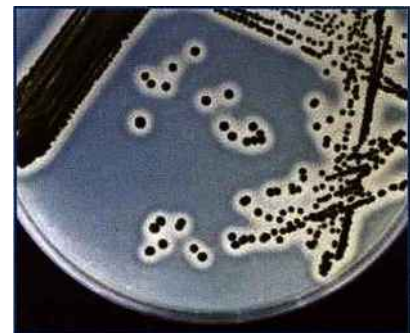


Photo 1. Aspect sur milieu RPFA des colonies de staphylocoques à coagulase positive (Crédit photo [Afssa](#)).

Résumé

Parmi les causes majeures d'épisodes toxiques alimentaires, les toxi-infections à staphylocoques sont dues à l'ingestion d'entérotoxines staphylococciques, protéines produites par des centaines d'espèces de staphylocoques à coagulase positive (*S. aureus* majoritairement). Contrairement aux staphylocoques qui les produisent et une fois produites dans la matrice alimentaire, les entérotoxines sont très stables aux conditions environnementales telles que la température et le pH. Après avoir décrit le germe et les toxines produites, l'accent sera mis sur les conditions requises (dont la température) pour qu'il y ait croissance de staphylocoques et production d'entérotoxines au travers d'un exemple de toxi-infection alimentaire collective.

* Ingénieur d'études - Afssa Lerqap.

Tableau I. Facteurs influençant la croissance et la production d'entérotoxines par *S. aureus*

Facteur	Croissance de <i>S. aureus</i>		Production d'entérotoxines par <i>S. aureus</i>	
	Optimum	Gamme	Optimum	Gamme
Température (°C)	37	7 – 48	40 – 45	10 – 48
pH	6 – 7	4 – 10	7 – 8	4 – 9,6
Activité de l'eau (A _w)	0,98	Aérobie : 0,83 à 0,99 Anaérobie : 0,90 à 0,99	0,98	Aérobie : 0,85 à 0,99 Anaérobie : 0,92 à 0,99
NaCl (%)	0	0 – 20	0	0 – 10
Potentiel d'oxydoréduction (E _h)	> + 200 mV	< - 200 mV à > + 200 mV	> + 200 mV	< - 100 mV à > + 200 mV
Atmosphère	Aérobie	anaérobie – aérobie	Aérobie (5 – 20 % O ₂)	anaérobie – aérobie

impliquée dans un cas d'intoxication alimentaire aux Etats-Unis [1, 2]. En sécurité sanitaire des aliments, les entérotoxines staphylococciques représentent la deuxième cause de toxo-infection alimentaire collective d'origine bactérienne en France [3].

Staphylococcus aureus est une bactérie aéro-anaérobie facultative présente sur la peau, les muqueuses et la sphère rhino-pharyngée des mammifères. Parmi les souches de *S. aureus*, certaines sont capables de synthétiser une ou plusieurs entérotoxines lorsque les conditions environnementales de croissance et d'entérotoxino-génèse (température, pH, concentration en sels, activité de l'eau...) sont favorables. Les principaux facteurs de croissance et de toxino-génèse de *S. aureus* sont résumés dans le tableau I [4].

S. aureus peut synthétiser des entérotoxines staphylococciques (ES) appartenant à la famille des exoprotéines pyrogéniques; à ce jour 23 types ont été décrits dans la littérature. Ces exoprotéines de poids moléculaire compris entre 22 et 29 kDa peuvent être préformées dans les matrices alimentaires

Tableau II. Caractéristiques majeures des entérotoxines staphylococciques

ES	Poids moléculaire (kDa)	pI (*)	Pouvoir émétique	Référence
A	27,100	7,3	+	[5] pour revue
B	28,336	8,6	+	[5] pour revue
C1	27,531	8,6	+	[5] pour revue
C2	27,531	7,8	+	[5] pour revue
C3	27,563	8,1	+	[5] pour revue
C (bovine)	27,618	7,6	+	[5] pour revue
C (ovine)	27,517	7,6	+	[5] pour revue
C (caprine)	27,600	7,0	+	[5] pour revue
D	26,360	7,4	+	[5] pour revue
E	26,425	7,0	+	[5] pour revue
G	27,043	5,7	+	[5] pour revue
H	25,210	5,65	+	[5] pour revue
I	24,928	?	+	[5] pour revue
J	28,565	8,65	-	[5] pour revue
K	25,539	6,5	-	[5] pour revue
L	24,593	8,66	-	[5] pour revue
M	24,842	6,24	-	[5] pour revue
N	26,067	6,97	-	[5] pour revue
O	26,777	6,55	-	[5] pour revue
P	26,608	6,19	-	[6]
Q	25,076	6,60	-	[7]
R	27,049	8,76	+	[8, 9]
S	26,217	?	+	[9]
T	22,614	?	+	[9]
U	27,192	6,20	-	[10]
U2	26,672	7,20	-	[11]
V	24,997	6,07	-	[11]

* Le point isoélectrique (ou pI) correspond au pH où la charge nette de la protéine est égale à 0. Les protéines sont chargées positivement à pH inférieur à leur pI et négativement à pH supérieur.

Summary

Staphylococcal food poisoning, in which major symptoms are vomiting and diarrhoea, occurs after ingestion of staphylococcal enterotoxins produced in food by enterotoxinogenic strains of coagulase-positive staphylococci mainly S. aureus. Staphylococcal food poisoning is reported to be one of the most common bacterial food-borne outbreak in many countries. Staphylococcal enterotoxins are normally not or only slightly inactivated during food processing, storage, distribution or during the preparation of the food in the kitchen. Therefore, if enterotoxinogenic staphylococci are able to grow in food to high numbers (more than 10⁶ to 10⁸ cfu/g or /ml) before they are killed there is still a risk for intoxication with consumption. In this article, S. aureus, staphylococcal enterotoxins and an example of food poisoning will be presented highlighting the importance of temperature during food processing for S. aureus growth and toxin production.

riches en protéines si les conditions de croissance du germe et de toxinogénèse sont atteintes. Cette famille de protéines présente des propriétés biologiques communes : pyrogénicité (élévation de la température corporelle) et activation des lymphocytes T (action superantigénique). Certaines ES possèdent également une activité émétique d'où leur impact avéré ou possible en sécurité sanitaire. Ainsi, parmi les ES dites « classiques » SEA à SEE possèdent une activité émétique. Pour les autres ES seules les toxines de types SEG, SEH, SEI, SER, SES et SET possèdent une activité émétique démontrée chez l'animal (Tableau II).

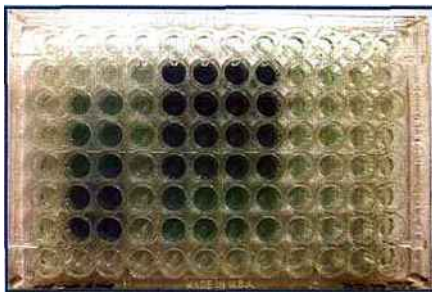


Photo 2 : Exemple de plaque ELISA quantitatif pour la détection de l'entérotoxine de type SEA. (Crédit photo Afssa).

Les entérotoxines staphylococciques sont solubles dans l'eau et les solutions salines. Elles sont résistantes à la plupart des enzymes protéolytiques telles que la pepsine ou la trypsine et gardent ainsi leur activité après ingestion, dans le tube digestif. Elles sont également résistantes à la chaleur et il est généralement admis qu'elles résistent aux barèmes de températures classiquement utilisées en industries agroalimentaires (Tableau III). Cependant, il est difficile de prévoir l'impact du traitement thermique sur l'activité des ES, puisque celle-ci dépend du type d'ES, de leur concentration et de la matrice alimentaire. Dans l'ensemble, les ES résistent à des conditions (traitement thermique, pH acide) qui détruisent facilement *S. aureus* lui-même.

Toxi-infection alimentaire collective à staphylocoques

Définition, symptomatologie associée

Avant de décrire un épisode de toxi-infection alimentaire collective (TIAC) rappelons tout d'abord quelques pré-requis tels que la définition, la symptomatologie associée, l'incidence en France et les conditions nécessaires pour son apparition.

Une TIAC est définie par l'incidence de deux cas ou plus, d'une maladie similaire, à symptomatologie gastro-intestinale le plus souvent, dont la cause peut être rapportée à une même origine alimentaire [12]. En France, les TIAC figurent sur la liste des trente maladies à déclaration obligatoire (DO) auprès des inspecteurs de santé publique vétérinaire (DDSV) ou des inspecteurs de santé publique des services d'affaires sanitaires et sociales (DDASS). Cette déclaration permet ainsi de diligenter une enquête épidémiologique afin d'identifier le (ou les) aliment(s) responsable(s) et de prendre des mesures correctives (modifications de préparations, réduction de la contamination des matières premières...) afin que l'incident ne se reproduise pas.

Bien que la période d'incubation et la sévérité des symptômes observés dépendent de la concentration d'entérotoxines ingérées et de la sensibilité de chaque individu [4], les premiers symptômes, nausées suivies de vomissements caractéristiques incoercibles (vomissements en fusées), apparaissent dans les 30 minutes à huit heures (trois heures en moyenne) après ingestion de l'aliment contaminé. Cette symptomatologie d'apparition rapide a d'ailleurs valu leur nom de « toxines du banquet » aux entérotoxines staphylococciques. Parmi les autres symptômes fréquemment décrits lors d'épisodes toxiques à staphylocoques, il est fait mention de douleurs abdominales, de diarrhées, vertiges, frissons et faiblesse générale parfois accompagnée d'une fièvre modérée. Lors des cas les plus sévères, des maux de tête, une prostration et une hypotension ont été rapportés. Dans la majorité des cas, les symptômes régressent spontanément sans avoir recours à un

Tableau III. Résistance de *S. aureus* et des entérotoxines au traitement thermique

Résistance de <i>S. aureus</i> au traitement thermique	Temps
D 50,0 (tampon phosphate 0,1 M)	9,5 – 42,2 min
D 55,0 (tampon phosphate 0,1 M)	3 min
D 62,8 (chlorure de sodium)	0,4 – 1,1 min
Résistance des entérotoxines au traitement thermique	Temps
D 100 (lait)	70 min
D 110 (lait)	26 min
D 120 (lait)	9,4 min

traitement spécifique dans les 18 à 24 heures, les diarrhées et la faiblesse générale ressentie pouvant durer 24 heures de plus [4]. Enfin, bien que la symptomatologie associée soit généralement bénigne, une hospitalisation peut s'avérer nécessaire pour les cas les plus graves. La déshydratation brutale due aux vomissements et aux diarrhées peut provoquer un état de choc. La mortalité reste exceptionnelle, atteignant les individus les plus sensibles à la déshydratation (nourrissons et personnes âgées) et les personnes atteintes d'une pathologie sous-jacente.

Bien que les TIAC soient des maladies à déclaration obligatoire, l'incidence réelle des TIAC à staphylocoques reste difficile à évaluer avec précision. En effet, comme nous l'avons évoqué précédemment, la maladie étant d'apparition rapide avec rétablissement en un à deux jours, la consultation médicale (et *a fortiori* la déclaration) ne s'impose pas dans la majorité des cas. Ainsi, il est à supposer qu'un grand nombre de foyers ayant eu lieu dans un environnement familial ne sont pas déclarés aux autorités sanitaires. Aussi, de nombreux auteurs considèrent que les TIAC à staphylocoques sont une des causes majeures de maladies d'origine alimentaire au niveau mondial [4, 13, 14].

Incidence en France

Qu'en est-il au niveau français ? L'Institut de Veille Sanitaire (InVS) recense tous les ans le nombre de foyers de TIAC déclarés [3]. Sur la période 1996-2006, 6755 foyers de TIAC ont été déclarés dont 1271 (18,8 %) pour lesquels *S. aureus* aurait joué un rôle. Les staphylocoques représentent ainsi la deuxième cause de TIAC en France derrière les salmonelles. Sur ces 1271 foyers rapportés, *S. aureus* a été l'agent confirmé (staphylocoques et/ou toxines retrouvés dans les aliments suspectés) dans 411 foyers correspondant à 6051 cas, 1245 hospitalisations et trois

décès et il a été suspecté (pas de staphylocoques ni de toxine retrouvés dans les aliments suspectés mais symptomatologie de type staphylococcique décrite) dans 870 foyers correspondant à 9807 cas, 898 hospitalisations et un décès.

Un exemple de toxi-infection alimentaire collective à staphylocoques

Grâce à un exemple d'épisode toxique survenu en Floride en septembre 1997 [15] analysons maintenant les cinq conditions requises pour que survienne une TIAC à staphylocoques :

- une source de staphylocoques producteurs d'entérotoxines,
- un moyen de transmission à l'aliment,
- un aliment favorable,
- une température favorable pendant le temps nécessaire à une multiplication bactérienne importante et à la toxinogénèse,
- une ingestion de toxines en quantité suffisante pour déclencher la maladie.

En septembre 1997, un épisode toxique survint lors d'un banquet pour un départ à la retraite. 31 participants sur les 125 furent malades. Des symptômes tels que des nausées (94 %), des vomissements (89 %) et des diarrhées (72 %) affectèrent les convives entre trois et six heures (3,4 heures en moyenne) après consommation des plats du banquet. Une prise en charge médicale fut nécessaire pour sept convives et deux furent hospitalisés.

L'enquête épidémiologique démontra que toutes les personnes malades avaient consommé du jambon pré-cuit.

Les analyses microbiologiques et immunochimiques réalisées sur les restes de jambon démontrèrent la présence de *S. aureus* et d'entérotoxines staphylococciques de type SEA.

Enfin, l'enquête apporta les éléments suivants sur la préparation du jambon : la veille, un jambon pré-cuit d'environ 8 kg fut acheté et rôti dans un four domestique pendant 1 heure 30 minutes à la température de 200°C, ce qui exclut l'origine d'une contamination primaire du produit par *S. aureus*. Une fois rôti et encore tiède, ce dernier fut découpé à l'aide d'une trancheuse non nettoyée avant utilisation. Les tranches de jambon furent alors placées dans des petits récipients en plastique stockés dans une glacière pendant six heures puis transférés dans un réfrigérateur toute la nuit avant le service du lendemain. A ce stade, deux hypothèses sur l'origine de la contamination peuvent être formulées : contamination de *S. aureus* post cuisson par une trancheuse souillée ou contamination d'origine humaine par manipulation et défaut d'hygiène. L'enquête démontra que la personne ayant préparé le jambon ne souffrait d'aucune infection staphylococcique apparente ce qui laisse à penser que la trancheuse

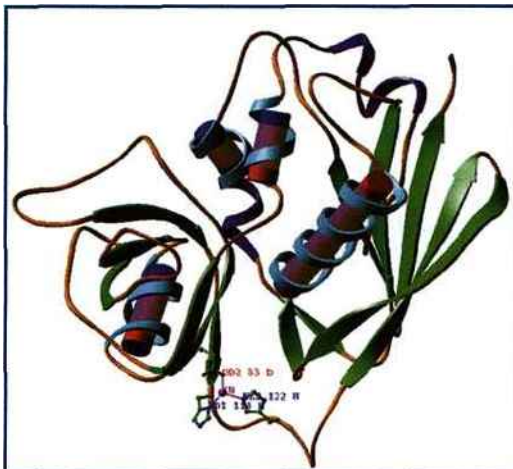


Photo 3 : Représentation de la structure 3D de l'entérotoxine de type SEC2 (Crédit photo Swaminathan, S. et al., 1995, *Nature Struct. Biol.* 2, 680-686)

serait à l'origine de la transmission de *S. aureus* du couteau vers l'aliment.

Comment expliquer le développement important de *S. aureus* et la production de toxines dans le jambon ? Nous avons vu précédemment que *S. aureus* tolérait des concentrations en sels pouvant atteindre 20 % tout à fait compatibles avec les teneurs de l'ordre de 3,5 % du jambon. De plus, compte tenu des plages de températures de croissance (7 à 48°C) et de toxinogénèse (10° à 48°C), la découpe du jambon encore tiède a permis de disséminer la contamination sur toute la surface des tranches offrant ainsi à *S. aureus* des conditions idéales pour se développer et excréter des entérotoxines. Enfin, le stockage de nombreuses tranches encore tièdes dans de petits récipients en plastique a pu nuire à un refroidissement rapide du jambon et peut expliquer les fortes croissances de *S. aureus* nécessaires à la production d'entérotoxines.

La prévention des toxi-infections alimentaires à staphylocoques est fondée sur des mesures d'hygiène visant à éviter ou à limiter la contamination des

aliments par *S. aureus*. Ces mesures doivent intégrer le contrôle des matières premières, les bonnes pratiques de manipulation, le nettoyage et la désinfection du matériel et des locaux, depuis le producteur jusqu'au consommateur. Cependant, ces dispositions ne suffisant pas à obtenir un taux de contamination nul, il est nécessaire de détruire les staphylocoques par un traitement adapté, thermique ou autre, avant qu'ils ne se soient multipliés, ou bien d'empêcher leur multiplication en maintenant les aliments en dessous de 6°C. Le respect de la chaîne du froid est capital en ce qui concerne les staphylocoques. Toute technologie alimentaire pratiquée dans une zone de température dangereuse doit être de courte durée ou doit s'appuyer sur d'autres paramètres que la température pour stopper la croissance de la bactérie. Les staphylocoques étant thermosensibles alors que leurs entérotoxines sont thermostables, l'assainissement d'un produit fortement contaminé par *S. aureus* n'est pas garanti par un traitement thermique : il faut alors considérer qu'une fois formées dans l'aliment, les entérotoxines ne peuvent être détruites.

... (bibliographie)

- [1] Becker, K., Keller, B., von Eiff, C., Bruck, M., Lubritz, G., Etienne, J., Peters, G. Enterotoxigenic potential of *Staphylococcus intermedius*. *Appl Environ Microbiol.* 67, 12, 5551-5557, 2001.
- [2] Khambaty, F. M., Bennett, R. W., Shah, D. B. Application of pulsed-field gel electrophoresis to the epidemiological characterization of *Staphylococcus intermedius* implicated in a food-related outbreak. *Epidemiol Infect.* 1, 75-81, 1994.
- [3] Jourdan-Da Silva, N., Vaillant, V. Surveillance des toxi-infections alimentaires collectives en France *Bull.Soc.Fr.Microbiol.* 23, 1, 7-14, 2008.
- [4] Anonyme. Draft Opinion of the Scientific Committee on Veterinary Measures relating to Public Health On Staphylococcal enterotoxins in milk products, particularly cheeses. Rapport adopté par le Comité vétérinaire permanent de la Direction Général Santé et consommateurs les 26 et 27 mars 2003 www.europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scv/out61_en.pdf
- [5] Le Loir, Y., Baron, F., Gautier, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genet Mol Res.* 2, 63-76, 2003.
- [6] Kuroda, M., Ohta, T., Uchiyama, I., Baba, T., Yuzawa, H., Kobayashi, I., Cui, L., Oguchi, A., Aoki, K., Nagai, Y., Lian, J., Ito, T., Kanamori, M., Matsumaru, H., Maruyama, A., Murakami, H., Hosoyama, A., Mizutani-Ui, Y., Takahashi, N. K., Sawano, T., Inoue, R., Kaito, C., Sekimizu, K., Hirakawa, H., Kuhara, S., Goto, S., Yabuzaki, J., Kanehisa, M., Yamashita, A., Oshima, K., Furuya, K., Yoshino, C., Shiba, T., Hattori, M., Ogasawara, N., Hayashi, H., Hiramatsu, K. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet.* 357, 1225-1240, 2001.
- [7] Diep, B. A., Carleton, H. A., Chang, R. F., Sensabaugh, G. F., Perdreau-Remington, F. Roles of 34 virulence genes in the evolution of hospital- and community-associated strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis.* 193, 11, 1495-1503, 2006.
- [8] Omoe, K., Ishikawa, M., Shimoda, Y., Hu, D. L., Ueda, S., Shinagawa K. Detection of seg, seh, and sei genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of the enterotoxin productivities of *S. aureus* isolates Harboring seg, seh, or sei genes. *J Clin Microbiol.* 40, 857-62, 2002.
- [9] Ono, H. K., Omoe, K., Imanishi, K., Iwakabe, Y., Hu, D. L., Kato, H., Saito, N., Nakane, A., Uchiyama, T., Shinagawa, K. Identification and characterization of two novel staphylococcal enterotoxins types S and T. *Infect Immun.* doi:10.1128/IAI.00045-08, 2008.
- [10] Letertre, C., Perelle, S., Dilasser, F., Fach, P. Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by the egc cluster of *Staphylococcus aureus*. *J Appl Microbiol* 95, 38-43, 2003.
- [11] Thomas, D. Y., Jarraud, S., Lemerrier, B., Cozon, G., Echasserieu, K., Etienne, J., Gougeon, M. L., Lina, G., Vandenesch, F. 2006. Staphylococcal enterotoxin-like toxins U2 and V, two new staphylococcal superantigens arising from recombination within the enterotoxin gene cluster. *Infect Immun* 74, 4724-34, 2006.
- [12] Delmas, G., Gally, A., Espié, A., Haeghebaert, S., Pihier, N., Weill, F. X., De Valk, H., Vaillant, V., Désenclos, J. C. Les toxi-infections alimentaires collectives en France entre 1996 et 2005. *BEH* 51-52, 418-422, 2006.
- [13] Balaban, N., Rasooly, A. Staphylococcal enterotoxins. *Int J Food Microbiol* 61, 1-10, 2000.
- [14] Mead, P. S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L. F., Bresee, J. S., Shapiro, C., Griffin, P. M., Tauxe, R. V. Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis* 5, 607-625, 1999.
- [15] Anonyme. Outbreak of staphylococcal food poisoning associated with precooked ham, *Morb Mort Wkly Rep.* 46, 50, 1189-1191, 1997.

2. Hennekinne J-A., Brun V., De Buyser M-L., Dupuis A., Ostyn A., Dragacci S. (2009). Innovative contribution of mass spectrometry to characterise staphylococcal enterotoxins involved in food outbreaks. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 3, 882-884.

Innovative Application of Mass Spectrometry for the Characterization of Staphylococcal Enterotoxins Involved in Food Poisoning Outbreaks[∇]

Jacques-Antoine Hennekinne,^{1*} Virginie Brun,² Marie-Laure De Buyser,¹ Alain Dupuis,²
Annick Ostyn,¹ and Sylviane Dragacci¹

AFSSA-LERQAP (French Agency for Food Safety, Laboratory for Study and Research on Quality of Food and on Food Processes),
European Union Community Reference Laboratory for Coagulase Positive Staphylococci Including *Staphylococcus aureus*,
23 avenue du Général De Gaulle, 94706 Maisons-Alfort cedex, France,¹ and CEA, DSV, iRTSV, Laboratoire d'Etude de
la Dynamique des Protéomes, F-38054 Grenoble, France, INSERM, U880, F-38054 Grenoble, France, and
Université Joseph Fourier, F-38054 Grenoble, France²

Received 19 August 2008/Accepted 1 December 2008

Staphylococcal poisoning is a common food-borne disease for which immunoassays to detect enterotoxins were developed, but these assays often lead to false diagnoses due to interferences or lack of specificity. Absolute quantitative mass spectrometry was for the first time successfully applied to an investigation of a staphylococcal outbreak due to coconut pearls.

Staphylococcal food poisoning (SFP) is one of the most common food-borne diseases (12, 15, 16), resulting from ingestion of staphylococcal enterotoxins (SEs) produced in food by enterotoxigenic strains of coagulase-positive staphylococci (CPS), mainly *Staphylococcus aureus* (11). The European Food Safety Authority (2) reported that SEs were involved in 4.1% of food poisoning outbreaks, but this percentage is certainly underestimated due to poor analytical performances in the detection and identification of SEs in food remnants. Most cattle carry staphylococci on their skin and mucous membranes, which can contaminate animal-derived products. *S. aureus* can also be transferred into food by handlers not respecting hygienic standards during manufacturing (3) or cooking (19).

To date, 23 SEs have been described: SEA to SEIV (21). All share superantigenic activity, whereas only few of them (SEA to SEI, SER, SES, and SET) have been proved to be emetic (16, 18). Until recently, SEs were hardly distinguishable from food proteins, as SEs are small (22- to 29-kDa) proteins without any physicochemical particularities. Their detection was possible only by immunoassay-based methods, such as the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Actually, qualitative or semiquantitative commercial kits are able either to detect SEA to SEE as a whole ("total" SEs) or to differentiate and quantify six or seven types of SE (SEA, SEB, SEC₁, SEC₂, SEC₃, SED, and/or SEE); none of those kits are able to detect SEG to SEIV (10).

Very recently, a mass spectrometry (MS)-based method enabling the detection and absolute quantification of SEA was developed (8). In this work, we compared this innovative analytical approach with the official ELISA method, the PCR and reverse transcription-PCR (RT-PCR) methods for characterization of *S. aureus* strains, and the conventional microbiology methods (enu-

meration and characterization of *S. aureus* strains) classically used for the characterization of SFP outbreaks.

Four SFP outbreaks associated with coconut pearls successively occurred in the Ile-de-France area (France) during July 2006. Out of 14 exposed people, 11 experienced nausea, vomiting, abdominal cramps, and diarrhea 2 to 7 hours after consumption of meals. One food sample from each outbreak was subjected to CPS counting, and isolated strains were analyzed by biotyping, pulsotyping by pulsed-field gel electrophoresis, and PCR targeting genes *sea* to *sej* and 23S rRNA (14). An RT-PCR for the *sea*, *sed*, and *sej* genes was performed to evaluate the expression of *se* mRNA. All culture supernatants of isolates were also tested for production of SEA to SED by a semiquantitative SE reversed passive latex agglutination (SET-RPLA) kit (Oxoid, Dardilly, France).

More than 10⁶ CFU of CPS/g was isolated from coconut pearl outbreak samples. The isolates were identified as *S. aureus*. They harbored a human biotype, an undistinguishable pulsed-field gel electrophoresis profile (data not shown), and a *sea*, *sed*, and *sej* gene pattern, and the RT-PCR proved the expression of *sea*, *sed*, and *sej* mRNA. SEA and SED were detected in supernatants by SET-RPLA (Table 1). These findings suggest that the same *S. aureus* strain was involved in the four outbreaks.

Detection of SEs in coconut pearls was performed by the European Union Community Reference Laboratory screening and confirmatory methods (1, 10). SEA and SED were detected in and quantified for all samples (Table 1).

MS detection and quantification of SEA were performed by the Protein Standard Absolute Quantification (PSAQ) method, using [¹³C₆, ¹⁵N₄]L-arginine- and [¹³C₆, ¹⁵N₂]L-lysine-labeled SEA as a standard (5). This internal standard was added to the food extract prior to immunochemical enrichment of SEA toxin as described in reference 6. After in-gel trypsin digestion, peptides were analyzed by nano-liquid chromatography-MS with a QToF mass spectrometer (Waters, Milford, MA). SEA quantification was drawn from the ratio of the unlabeled (endogenous SEA) and labeled (PSAQ standard) peptide signals for the two SEA-specific peptides NVT

* Corresponding author. Mailing address: AFSSA-LERQAP, TOP BAC, 23 avenue du Général De Gaulle, 94706 Maisons-Alfort cedex, France. Phone: 33 1 49 77 46 83. Fax: 33 1 49 77 46 66. E-mail: ja.hennekinne@afssa.fr.

[∇] Published ahead of print on 12 December 2008.

TABLE 1. Results obtained for food samples^a

Outbreak no.	CPS count (10 ⁶ CFU/g) ^b	Amt of SE (ng/g) by analysis of coconut pearl samples		
		SEA ^c	SED ^c	SEA ^d
1	13	3.8 ± 1.6	2.4 ± 0.5	NT
2	50	1.3 ± 0.2	5.8 ± 1.3	1.5 ± 0.1
3	10	4.7 ± 1.6	6.3 ± 1.6	NT
4	30	6.7 ± 0.9	8.2 ± 1.3	NT

^a The results for analyses of isolated strains were as follows: biotyping revealed the human biotype; molecular tests (PCR targeting 23S rRNA and *sea* to *sej* and RT-PCR targeting mRNA) revealed the *S. aureus sea*, *sed*, and *sej* genes and mRNA; and immunological tests with supernatants (SET-RPLA, a qualitative test) revealed SEA and SED positivity.

^b Determined by microbiological tests.

^c Determined by immunological tests ($n = 3$) targeting SEA to SEE. Values shown are for quantitative ELISA. All values for qualitative ELISA were >0.1.

^d Determined by quantitative MS tests ($n = 3$) targeting SEA. NT, not tested.

VQELDLQAR and YNLYNSDVFDGK after integration of the corresponding current ion peaks. By use of this PSAQ method, the amounts of native SEA were evaluated to be 1.4 and 1.5 ng/g with NVTVQELDLQAR and YNLYNSDVF DGK, respectively (mean, 1.5 ± 0.1 ng/g) (Table 1). These SEA estimates were in close range of those obtained using the European Union Community Reference Laboratory confirmatory method (1.3 ± 0.2 ng/g).

Immunoassays used to detect SEs in food can lead to a false or incomplete diagnosis, as only SE types SEA to SEE can be detected in routine analysis. However, other SEs, such as SEH, have clearly been involved in three food poisoning outbreaks (11, 13, 19), whereas SEG and SEI (17) and SER, SES, and SET (18) were proved to be more or less emetic, with a possible incidence in food safety. In such cases, diagnosis of SFP based on immunoanalysis would not confirm the involvement of SEs. Indeed, there has been an increasing need for better characterization of strains and for new analytical methods for improvement of SE detection and SFP diagnosis.

In order to evaluate the toxigenic potential of strains isolated from SFP outbreaks, various PCR assays are used to detect *se* genes (7, 14). Even if the PCR approach is specific, highly sensitive, and rapid, it can only demonstrate the presence of genes encoding toxins. To investigate transcription of *se* genes, RT-PCR tools have been developed (15), but these methods do not demonstrate the expression of detectable or poisoning levels of toxins in food. Thus, some authors developed proteomics approaches to demonstrate SE expression in culture supernatants (4, 20) or to detect and quantify SEs in food matrices (5, 6).

In the present study, the SE etiology of the outbreak was easily confirmed due to (i) the typical associated symptomatology, (ii) the high number of CPS recovered from food remnants, and (iii) the toxin amounts detected in food samples by ELISA and quantitative MS (Table 1). With the MS results taken into account, the ingested dose in the present outbreaks could be evaluated as follows: considering the average weight of one coconut pearl (75 g) and the smallest amounts of SEA detected in the analyzed samples (1.3 and 1.5 ng/g by use of the ELISA and MS tools, respectively), the total intake of SEA per body was estimated at around 100

ng, which agrees with epidemiological studies involving SEA (3, 9, 11).

In conclusion, until now both official screening and confirmatory methods based on the same immunoassay principle have suffered from severe limitations, such as the difficulty in obtaining specific antibodies for every incriminated or suspected SE. This case-analytical study has shown the very interesting and additional information which can be retrieved from the combination of PCR-based tools and quantitative MS, compared to the single use of microbiological tests and ELISA kits, which depend on tedious development of specific antibodies. Thus, it is crucial to continue developing a new analytical complementary approach including physicochemical methods using specific SE trypsinic peptides. When the availability of primary sequence information for all the known SEs is taken advantage of, specific trypsinic peptides (proteotypic peptides) can be easily targeted to identify and exactly quantify most of the SEs by the present MS method and to properly characterize and investigate SFP outbreaks.

We thank G. Delmas (French Institute for Public Health Surveillance, Saint Maurice, France) and H. Isnard (Ministry of Health, Paris, France) for providing outbreak details.

REFERENCES

1. Anonymous. 2007. Commission regulation no. 1441/2007 of 5 December 2007. OJEU L322:12–29.
2. Anonymous. 2007. The community summary report 2006: trends and sources of zoonoses, zoonotic agents, antimicrobial resistance and foodborne outbreaks in the European Union in 2006. EFSA J. 130:1–310.
3. Asao, T., Y. Kumeda, T. Kawai, T. Shibata, H. Oda, K. Haruki, H. Nakazawa, and S. Kozaki. 2003. An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. Epidemiol. Infect. 130:33–40.
4. Bernardo, K., N. Pakulat, M. Macht, O. Krut, H. Seifert, S. Fleer, F. Hunger, and M. Kronke. 2002. Identification and discrimination of Staphylococcus aureus strains using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. Proteomics 2:747–753.
5. Brun, V., A. Dupuis, A. Adrait, M. Marcellin, D. Thomas, M. Court, F. Vandenesch, and J. Garin. 2007. Isotope-labeled protein standards: toward absolute quantitative proteomics. Mol. Cell Proteomics 6:2139–2149.
6. Callahan, J. H., K. J. Shefcheck, T. L. Williams, and S. M. Musser. 2006. Detection, confirmation, and quantification of staphylococcal enterotoxin B in food matrices using liquid chromatography-mass spectrometry. Anal. Chem. 78:1789–1800.
7. Cha, J. O., J. K. Lee, Y. H. Jung, J. I. Yoo, Y. K. Park, B. S. Kim, and Y. S. Lee. 2006. Molecular analysis of Staphylococcus aureus isolates associated with staphylococcal food poisoning in South Korea. J. Appl. Microbiol. 101:864–871.
8. Dupuis, A., J. A. Hennekinne, J. Garin, and V. Brun. 2008. Protein Standard Absolute Quantification (PSAQ) for improved investigation of staphylococcal food poisoning outbreaks. Proteomics 8:4633–4636.
9. Evenson, M. L., M. W. Hinds, R. S. Bernstein, and M. S. Bergdoll. 1988. Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. Int. J. Food Microbiol. 7:311–316.
10. Hennekinne, J.-A., F. Guillier, S. Perelle, M.-L. De Buyser, S. Dragacci, S. Kryz, and B. Lombard. 2007. Intralaboratory validation according to the EN ISO 16 140 Standard of the Vidas SET2 detection kit for use in official controls of staphylococcal enterotoxins in milk products. J. Appl. Microbiol. 102:1261–1272.
11. Ikeda, T., N. Tamate, K. Yamaguchi, and S. Makino. 2005. Mass outbreak of food poisoning disease caused by small amounts of staphylococcal enterotoxins A and H. Appl. Environ. Microbiol. 71:2793–2795.
12. Jablonski, L. M., and G. A. Bohach. 1997. Staphylococcus aureus, p. 353–357. In M. P. Doyle, L. R. Beuchat, and T. J. Montville (ed.), Food microbiology fundamentals and frontiers. ASM Press, Washington, DC.
13. Jorgensen, H. J., T. Mathisen, A. Lovseth, K. Omoe, K. S. Qvale, and S. Loncarevic. 2005. An outbreak of staphylococcal food poisoning caused by enterotoxin H in mashed potato made with raw milk. FEMS Microbiol. Lett. 252:267–272.
14. Kerouanton, A., J. A. Hennekinne, C. Letertre, L. Petit, O. Chesneau, A. Brisabois, and M. L. De Buyser. 2007. Characterization of Staphylococcus

- aureus strains associated with food poisoning outbreaks in France. *Int. J. Food Microbiol.* **115**:369–375.
15. Lee, Y. D., B. Y. Moon, J. H. Park, H. I. Chang, and W. J. Kim. 2007. Expression of enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates based on mRNA analysis. *J. Microbiol. Biotechnol.* **17**:461–467.
 16. Le Loir, Y., F. Baron, and M. Gautier. 2003. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genet. Mol. Res.* **2**:63–76.
 17. Omoe, K., M. Ishikawa, Y. Shimoda, D. L. Hu, S. Ueda, and K. Shinagawa. 2002. Detection of *seg*, *seh*, and *sei* genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of the enterotoxin productivities of *S. aureus* isolates harboring *seg*, *seh*, or *sei* genes. *J. Clin. Microbiol.* **40**:857–862.
 18. Ono, H. K., K. Omoe, K. Imanishi, Y. Iwakabe, D. L. Hu, H. Kato, N. Saito, A. Nakane, T. Uchiyama, and K. Shinagawa. 2008. Identification and characterization of two novel staphylococcal enterotoxins, types S and T. *Infect. Immun.* **76**:4999–5005.
 19. Pereira, M. L., L. S. Do Carmo, E. J. Dos Santos, J. L. Pereira, and M. S. Bergdoll. 1996. Enterotoxin H in staphylococcal food poisoning. *J. Food Prot.* **59**:559–561.
 20. Pocsfalvi, G., G. Cacace, M. Cuccurullo, G. Serluca, A. Sorrentino, G. Schlosser, G. Blaiotta, and A. Malorni. 2008. Proteomic analysis of exoproteins expressed by enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains. *Proteomics* **8**:2462–2476.
 21. Schlievert, P. M., and L. C. Case. 2007. Molecular analysis of staphylococcal superantigens. *Methods Mol. Biol.* **391**:113–126.

3. Dupuis A., Hennekinne J-A., Garin J., Brun V. (2008). Protein Standard Absolute Quantification (PSAQ) for improved investigation of staphylococcal food poisoning outbreaks. *Proteomics*. 8, 22, 4633-4636.

TECHNICAL BRIEF

Protein Standard Absolute Quantification (PSAQ) for improved investigation of staphylococcal food poisoning outbreaks

Alain Dupuis^{1, 2, 3*}, Jacques-Antoine Hennekinne^{4*}, Jérôme Garin^{1, 2, 3} and Virginie Brun^{1, 2, 3}

¹ CEA, DSV, iRTSV, Laboratoire d'Etude de la Dynamique des Protéomes, Grenoble, France

² INSERM U880, Grenoble, France

³ Université Joseph Fourier, Grenoble, France

⁴ AFSSA-LERQAP, French Agency for Food Safety, European Union Community Reference Laboratory for Coagulase Positive Staphylococci including *Staphylococcus aureus*, Maisons-Alfort, France

Staphylococcal enterotoxins are major causing agents of food-borne diseases. Their detection in food remnants for risk assessment or food poisoning outbreaks investigation suffers from a lack in comprehensive immunological tools. In this study, we demonstrate that the combination of immunocapture and Protein Standard Absolute Quantification (PSAQ) strategy, which uses isotope-labeled enterotoxins as internal standards for MS-based analysis, is powerful to specifically identify and quantify these contaminating agents in food matrices. This approach is believed to significantly improve the elucidation of staphylococcal food poisoning outbreaks.

Received: April 14, 2008

Revised: June 11, 2008

Accepted: June 16, 2008

Keywords:

Enterotoxin / Food poisoning / Mass spectrometry / Protein standard absolute quantification / Quantification

We have developed an innovative strategy, Protein Standard Absolute Quantification (PSAQ), which uses full-length isotope-labeled proteins as isotope-dilution standards for MS-based quantification of target proteins in complex matrices [1]. As the quantification standards display the same biochemical features as the target proteins, they can be spiked into the samples at early stages of the analytical process. Thus, in contrast with AQUA [2] and QconCAT [3] approaches, which use peptide standards for MS-based absolute quantification, PSAQ allows a highly accurate quantification even if the sample is extensively pre-

fractionated before MS analysis [1, 4]. PSAQ also avoids differences in digestion yields between the internal standard and the target protein [1, 5]. Finally, PSAQ offers the largest sequence coverage for quantification, which increases detection specificity and measurement robustness [1]. Taking advantage of these potencies, we combined PSAQ strategy and immunocapture for the detection and absolute quantification of traces of staphylococcal enterotoxin A (SEA), a major agent of food poisoning [6], in contaminated food samples.

Staphylococcal food poisoning (SFP) is a common food-borne disease resulting from ingestion of staphylococcal enterotoxins (SE) preformed in food by *Staphylococcus aureus* strains [7]. In the United States, SE are responsible for 185 000 annual cases of food poisoning [8]. In France, SE represent the second cause of food-borne diseases after *Salmonella* [9]. To date, 19 staphylococcal enterotoxins and related toxins ("enterotoxin-like" proteins) have been described [10]. Strains isolated from food involved in SFP mainly pro-

Correspondence: Dr. Virginie Brun, CEA, DSV, iRTSV, Laboratoire d'Etude de la Dynamique des Protéomes, F-38054 Grenoble, France

E-mail: virginie.brun@cea.fr

Fax: +33-4-3878-5051

Abbreviations: MRM, multiple reaction monitoring; PSAQ, protein standard absolute quantification; SE, staphylococcal enterotoxins; SFP, staphylococcal food poisoning

* These authors contributed equally to this work.

duce SEA and to a lesser extent SED, SEB and SEC [6]. However, due to the lack of specific diagnosis tools against numerous SE and related toxins, many SFP outbreaks remain unsolved. SFP is clinically characterized by gastroenteritis occurring between 1 to 8 h after food consumption. The biological diagnosis of SFP is conclusive when SE are detected in food remnants [11]. The detection of SE is classically performed using immunological techniques (ELISA) [12]. However, the immunological detection of SE displays major drawbacks. First, due to the high sequence and structural homology between SE, very few specific antibodies are available. Secondly, the complexity of food matrices often generates non-specific reactions [12]. Finally, the well-known IgG-binding staphylococcal protein A is co-secreted in food with SE and can interfere with the assay [12]. Consequently, commercial kits are available only for the detection of five enterotoxins (SEA to SEE) and suffer from serious limitations in terms of sensitivity, specificity and suitability for complex food matrices analysis.

We thus investigated the potential of the PSAQ method as an alternative to ELISA for SFP outbreaks characterization. Semi-hard cow-milk cheese was first chosen as a model, as it represents a high risk for *S. aureus* growth and SE production. The cheese model was manufactured in the “*Lactic Acid Bacteria and Opportunistic Pathogens*” laboratory of the French National Institute for Agricultural Research (Jouy en Josas, France). A SEA-producing *S. aureus* strain was inoculated into the milk before processing. According to the official procedure for dairy products control, a piece of cheese (25 g) was homogenized, depleted from caseins and the extract was concentrated by dialysis against PEG (see reference [12] for more details). This extract was investigated in parallel using a reference quantitative ELISA [12] or using our MS-based PSAQ method. For PSAQ analysis, the cheese extract was spiked with 100 ng of SEA PSAQ standard isotopically labeled with [$^{13}\text{C}_6$, $^{15}\text{N}_2$] L-lysine and [$^{13}\text{C}_6$, $^{15}\text{N}_4$] L-arginine (for details see reference [1]). The spiked cheese extract was passed through an immunoaffinity column (Bio-control Systems, Lyon, France). This column is designed to capture five SE (SEA to SEE) but, as warned by the manufacturer, displays cross-reactivity with other staphylococcal toxins such as TSST-1. The eluate was collected and submitted to short-run SDS-PAGE. The region of the gel containing the endogenous enterotoxin and its isotope-labeled counterpart (25–30-kDa region) was excised and submitted to digestion with trypsin. This denaturing electrophoresis dramatically improves the digestion of SE, which are protease-resistant proteins, and increases sample decomplexification. The proteolytic peptides extracted from the gel were analyzed in nanoLC-MS using a QTOF mass spectrometer (Waters, Milford, MA). Whereas the low-selectivity immunoaffinity column allows a large-spectrum enterotoxin capture, highly specific assignment of the captured SE is provided by the MS identification of peptides unique to each toxin (*i.e.* proteotypic peptides). One such proteotypic peptide (peptide NVTVQELDLQAR) was detected in the cheese

sample, specifically indicating the presence of endogenous SEA. Quantification was performed by comparing the integrated peaks of endogenous/labeled peptide extracted ion chromatograms (MassLynx software, Waters). The endogenous SEA was detected at 2.5 ± 0.2 ng/g of cheese ($n = 3$) consistently with the ELISA estimate (2.9 ± 0.3 ng/g; $n = 3$).

To go beyond this proof of concept, we applied the same PSAQ strategy to investigate a naturally contaminated food matrix. A Chinese dessert (coco-pearls), involved in a food poisoning outbreak in France in 2006 (11 patients declared), was collected by the French Agency for Food Safety (AFSSA). From this sample, AFSSA isolated a *Staphylococcus aureus* strain carrying the gene encoding SEA. An aliquot of this coco-pearl sample (25 g) was homogenized, centrifuged and the supernatant was concentrated by dialysis against PEG. The extract was tested concomitantly using ELISA or PSAQ methodology. For PSAQ quantification, the extract was spiked with 100 ng of SEA PSAQ standard and was processed and analyzed as described above for the cheese sample (see Fig. 1). Two proteotypic peptides specifically indicated the presence of endogenous SEA (peptides YNLYNSDVFDGK and NVTVQELDLQAR). Using these peptides, SEA was quantified down to 1.47 ± 0.05 ng/g of food ($n = 3$). The difference between estimates (mean values) obtained with these two proteotypic peptides was as low as 0.7%. This result was in agreement with the 1.3 ± 0.2 ng/g ($n = 3$) ELISA estimate obtained from the same sample and was consistent with the symptoms declared (toxic dose = 40 ng according to Ikeda *et al.* [13]).

In this work, we have harnessed the power of the PSAQ strategy for the specific detection and quantification of SEA in food matrices. The use of isotope dilution with PSAQ standards allows an accurate quantification. Accordingly, the PSAQ analysis and the established ELISA gave comparable estimates and displayed similar sensitivity. On top, PSAQ methodology displayed an unrivalled detection specificity related to proteotypic peptides detection. To perform a relevant comparison with the ELISA estimates, we had to spike the PSAQ standard in the PEG-concentrated food extracts prepared for ELISA testing. However, in contrast to the ELISA approach, PSAQ standards can be added in the food homogenate at the very beginning of the analytical process, enabling to assess the eventual enterotoxin losses during the extraction/concentration procedure. This simple modification would further increase the accuracy of enterotoxin quantification in food.

The PSAQ methodology represents an attractive alternative to immunoassays especially for other previously undetected SE. In this aim, we analyzed 13 SE and defined a panel of 97 theoretical proteotypic peptides potentially allowing the unambiguous MS discrimination of any of these SE (see Supporting Information). From the MS analysis of these 13 toxins using a QTOF mass spectrometer, we further experimentally qualified 38 of these peptides. This panel of qualified proteotypic peptides potentially allows the unambiguous assignment of these 13 SE. At present, we are

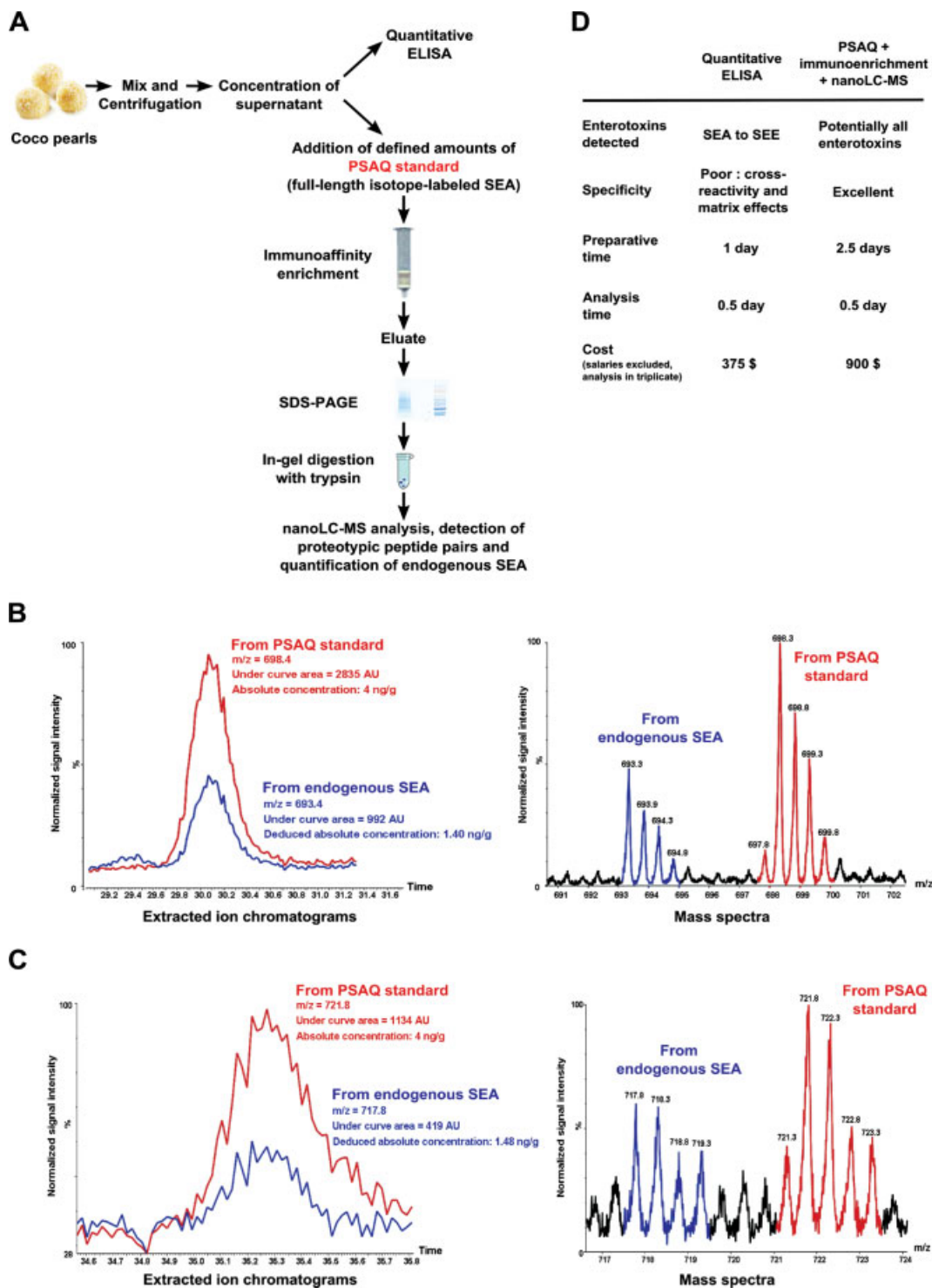


Figure 1. PSAQ detection and quantification of staphylococcal enterotoxin A (SEA) in coco-pears incriminated in a staphylococcal food poisoning outbreak. (A) Coco-pears involved in a food poisoning outbreak in France in 2006 were collected by the French Agency for Food Safety. A coco-pearl sample (25 g) was homogenized, centrifuged and the supernatant was concentrated by dialysis against polyethylene glycol. The extract was tested concomitantly using quantitative ELISA or PSAQ method. Regarding MS analysis, the concentrated extract was spiked with 100 ng of SEA PSAQ standard, immunoenriched, and submitted to SDS-PAGE and trypsin digestion. The proteolytic peptides were analyzed with nanoLC-MS analysis. Two pairs of proteotypic peptides specifically indicated the presence of endogenous SEA and allowed quantification. Typical raw data obtained with the proteotypic peptides NVTVQELDLQAR (B) and YNLYNSDVFQDGK (C) are shown. The relative features of the quantitative ELISA and the MS-based PSAQ strategy for SFP investigation are presented in (D).

synthesizing a library of isotope-labeled full-length SE. These enterotoxin PSAQ standards will be spiked simultaneously in naturally contaminated samples. The SE PSAQ library will thus allow multiplex detections and quantifications of SFP-incriminated enterotoxin(s).

The present experiments, performed on a Q-TOF mass spectrometer, gave a sensitivity limit comparable to that of the established ELISA. However, the use of the multiple reaction monitoring (MRM) method on a triple quadrupole instrument for MS analysis is expected to lower the detection sensitivity by a factor of at least ten. QTOF mass spectrometers present a limited dynamic range that keeps the linearity of the present method within a 1 to 2 log-range. The MRM method should extend the dynamic range of the present assay to up to five logs [14]. Finally, through the choice of targeted transitions, MRM should also dramatically improve the detection of some of the 59 theoretical SE proteotypic peptides that were not observed with QTOF (see Supporting Information), thus increasing the sequence coverage for identification and quantification of SE.

The present PSAQ method overpasses specific technical limitations of existing ELISA for SE characterization but its throughput and cost *per* analysis compare unfavorably with ELISA. This last method is no doubt the paradigm of the low-cost and high-throughput technique for the detection and quantification of biomarkers down to sub-nanomolar concentrations in large sample cohorts. However, the timescale for ELISA assay development is in the range of a year and high developmental costs, up to the million of dollars, preclude systematic ELISA optimization for any potential target or biomarker [14]. This cost also limits ELISA economical pertinence for small panels' characterization such as SFP elucidation or candidate biomarker evaluation. In this regard, the versatility and low developmental cost of the PSAQ methodology position it as good alternative to ELISA for these specific applications.

In conclusion, PSAQ strategy undoubtedly represents the ideal alternative methodology to investigate SFP outbreaks unsolved with the existing immunological tools. This will allow the evaluation of the digestive pathogenicity of poorly characterized SE.

The authors thank Dr. Annie Adrait, Audrey Bulete and Magali Court for MS support, Dr. Christophe Bruley and Véronique Dupierris for computer assistance and Pr François Vandenesch and Cédric Badiou for their expertise in staphylococcal toxins. These studies were supported by grants from Sanofi-Aventis France and Bayer Pharma as part of a multi-organism call for proposals and by grants from the French Agency for Research (ANR-06-PNRA-029).

The authors have declared no conflict of interest.

References

- [1] Brun, V., Dupuis, A., Adrait, A., Marcellin, M. *et al.*, Isotope-labeled protein standards: toward absolute quantitative proteomics. *Mol. Cell. Proteomics* 2007, **6**, 2139–2149.
- [2] Gerber, S. A., Rush, J., Stemman, O., Kirschner, M. W., Gygi, S. P., Absolute quantification of proteins and phosphoproteins from cell lysates by tandem MS. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003, **100**, 6940–6945.
- [3] Beynon, R. J., Doherty, M. K., Pratt, J. M., Gaskell, S. J., Multiplexed absolute quantification in proteomics using artificial QCAT proteins of concatenated signature peptides. *Nat. Methods* 2005, **2**, 587–589.
- [4] Hanke, S., Besir, H., Oesterheld, D., Mann, M., Absolute SILAC for accurate quantitation of proteins in complex mixtures down to the attomole level. *J. Proteome Res.* 2008, **7**, 1118–1130.
- [5] Janecki, D. J., Bemis, K. G., Tegeler, T. J., Sanghani, P. C. *et al.*, A multiple reaction monitoring method for absolute quantification of the human liver alcohol dehydrogenase ADH1C1 isoenzyme. *Anal. Biochem.* 2007, **369**, 18–26.
- [6] Balaban, N., Rasooly, A., Staphylococcal enterotoxins. *Int. J. Food Microbiol.* 2000, **61**, 1–10.
- [7] Dinges, M. M., Orwin, P. M., Schlievert, P. M., Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Rev.* 2000, **13**, 16–34.
- [8] Mead, P. S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L. F. *et al.*, Food-related illness and death in the United States. *Emerg. Infect. Dis.* 1999, **5**, 607–625.
- [9] Delmas, G., Gallay, A., Espié, E., Haeghebaert, S. *et al.*, Les toxi-infections alimentaires collectives en France entre 1996 et 2005. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire* 2006, **51-52**, 418–422.
- [10] Thomas, D., Chou, S., Dauwalder, O., Lina, G., Diversity in *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Chem. Immunol. Allergy* 2007, **93**, 24–41.
- [11] Bryan, F. L., Guzewich, J. J., Todd, E., Surveillance of food-borne disease II. Summary and presentation of descriptive data and epidemiologic patterns; their values and limitations. *J. Food Prot.* 1997, **60**, 567–578.
- [12] Hennekinne, J. A., Ostyn, A., Guillier, F., Gohier, M. *et al.*, Interlaboratory validation of the Vidas SET2 kit for detection of staphylococcal enterotoxins in milk products. *J. AOAC Int.* 2007, **90**, 756–764.
- [13] Ikeda, T., Tamate, N., Yamaguchi, K., Makino, S., Mass outbreak of food poisoning disease caused by small amounts of staphylococcal enterotoxins A and H. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005, **71**, 2793–2795.
- [14] Stahl-Zeng, J., Lange, V., Ossola, R., Eckhardt, K., *et al.*, High sensitivity detection of plasma proteins by multiple reaction monitoring of N-glycosites. *Mol. Cell. Proteomics* 2007, **6**, 1809–1817.

4. Kérouanton A., Hennekinne J-A., Letertre C., Petit L., Chesneau O., Brisabois A., De Buyser M-L (2007). Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. *Int. J. Food Microbiol.* 115, 369-375.

Short communication

Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France

A. Kérouanton ^a, J.A. Hennekinne ^a, C. Letertre ^a, L. Petit ^a,
O. Chesneau ^b, A. Brisabois ^a, M.L. De Buyser ^{a,*}

^a Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, Laboratoire d'Etudes et de Recherches sur la Qualité des Aliments et des Procédés agro-alimentaires (AFSSA-Lerqap), 23 Avenue du Général de Gaulle, 94706 Maisons-Alfort cedex, France

^b Unité des Agents Antibactériens, Département de Microbiologie Fondamentale et Médicale, Institut Pasteur, 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris cedex 15, France

Received 22 May 2006; received in revised form 25 October 2006; accepted 30 October 2006

Abstract

Enterotoxins produced by *Staphylococcus aureus* are responsible for staphylococcal food-poisoning outbreaks (SFPO). In France, SFPO are the second cause of food-borne diseases after *Salmonella*. However, very little is known about the strains involved. The objective of this study was to characterize the staphylococcal strains related to these SFPO through phenotypic and genotypic analyses. A total of 178 coagulase-positive staphylococcal isolates recovered from 31 SFPO (1981–2002) were screened through biotyping. Thirty-three strains representative of the different biotypes in each SFPO were further examined for *Sma*I macrorestriction-type, phage-type, resistance to various antimicrobial drugs, presence of staphylococcal enterotoxin (*se*) genes *sea* to *sei*, and production of enterotoxins SEA to SED. All these 33 strains were identified as *S. aureus* species: 27 were of human biotypes and six ovine or non-host-specific biotypes. Most (74.1%) strains reacted with group III phages. Eleven strains were resistant to at least two classes of antibiotics and among them, two were resistant to methicillin. Twenty-nine strains carried one or several of the eight *se* genes tested; the gene *sea* was most common ($n=23$), and often linked to *sed* ($n=12$) or *seh* ($n=5$). The novel *se* genes *seg-i* were in all cases associated with *se* genes *sea* to *sed* except for one strain which carried only *seg* and *sei*. Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) of *Sma*I macrorestriction digests of the 33 strains discriminated 32 PFGE patterns grouped into nine biotype-specific clusters. All five strains carrying *sea* and *seh* were grouped together into the same sub-cluster. Three of the four *se*-gene-negative strains were in one PFGE cluster: all four should be tested for *se* genes not included in this study and, if negative, be further investigated for the presence of unidentified SEs.

   2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: *Staphylococcus aureus*; Food-poisoning; PFGE; Enterotoxin

1. Introduction

Staphylococcal food-poisoning (SFP) is caused by staphylococcal enterotoxins (SEs) produced during massive growth of *Staphylococcus aureus* in food. SFP is a prevalent cause of food-borne disease worldwide (Shimizu et al., 2000; Jablonski and Bohach, 2001). In France, *S. aureus* represents the second cause of food-borne disease after *Salmonella*. It was confirmed as the aetiological agent of 86 outbreaks and suspected for a further 173, out of a total of 1787 food-borne disease outbreaks

reported in 2001–2003 (Delmas et al., 2005). SFP is suspected when the symptoms including nausea, violent vomiting, abdominal cramps and diarrhoea, affect the patients between 1 and 8 h after food consumption. The diagnosis of SFP is generally confirmed by at least one of the following: (i) the recovery of $>10^5$ *S. aureus*/g from food remnants, (ii) the detection of SEs in food remnants or (iii) the isolation of *S. aureus* of the same phage-type from both the patients and food remnants (Bryan et al., 1997). Conclusive diagnosis of SFP is mainly based on the demonstration of SEs in the food. Commercial kits are available to detect the five SEs described in the 1960s: SEA to SEE (Hennekinne et al., 2006). However, the situation is now more complicated due to the description

* Corresponding author. Tel.: +33 1 49 77 46 58; fax: +33 1 49 77 46 66.
E-mail address: m.debuyser@afssa.fr (M.L. De Buyser).

of 15 novel SEs that cannot be detected by the kits: SEG to SEIR, SEIU (Letertre et al., 2003a), SEIU2 and SEIV (Thomas et al., 2006). Nevertheless, only three of the novel SEs, SEG to SEI, have been shown, like SEs A to E, to cause vomiting after oral administration to a primate. The other SEs either lack emetic properties (SEIL, SEIQ), or have yet to be tested (SEJ, SEIK, SEIM-P, SEIR, SEIU, SEIU2 and SEIV), and it has been suggested that they be designated SE-like proteins (Lina et al., 2004). In-house ELISA methods have been developed to detect SEG to SEI produced in cultures (Omoie et al., 2002) and SEH in food (Ikeda et al., 2005; Jorgensen et al., 2005a). However, these methods are not yet commercially available, and therefore, these novel SEs can only be implicated in SFPO by identification of *se* genes in staphylococcal isolates or in food samples (McLauchlin et al., 2000; Ikeda et al., 2005).

Epidemiological details of most of the French SFPO are unpublished. Even when these outbreaks are described, few of

the staphylococcal strains are characterized because phage-typing or other typing methods are rarely used to confirm SFPO in France (Bonnetain et al., 2003). However, with the emergence of novel SEs, there is a growing need for characterization of suspected strains including the identification of novel *se* genes to improve SFP diagnosis. The aim of this work was to characterize the staphylococcal strains related to these SFPO through phenotypic and genotypic analyses. The strains were phenotypically compared by analysis of the various *S. aureus* biotypes, drug susceptibility testing, phage-typing, and testing for the ability to produce SEs A to D *in vitro*. Genotyping included the determination of the PFGE pattern after DNA macrorestriction. This provided information about the genetic relationship between strains and has previously proved useful for determining the source of *S. aureus* in SFPO (Chiou et al., 2000; Martin et al., 2004). We also tested for the genes *sea-e* encoding the classical SEs, and genes *seg-i* encoding the novel SEs known to be emetic.

Table 1
Epidemiological details of the 31 food poisoning outbreaks

Outbreak	Year	Number at risk/ill/hospitalized	Incubation period	Symptoms	Food	<i>S. aureus</i> CFU/g of food	SE detected in food sample ^a	SFPO assessment
1 ^b	1981	NK/4/NK	4 h	NK	Raw milk semi-hard cheese	3.0×10^7	SEA	C
2 ^b	1983	7/4/3	3 h	V	Cooked beef	7.5×10^9	SEA	C
3	1983	NK/20/NK	3 h	AP, V	Raw milk semi-hard cheese	2.0×10^6	SEA, SED	C
4	1983	NK/85/3	3 h	N	Rice and tuna salad	3.0×10^7	SEA	C
5 ^b	1983	NK/4/0	3.5 h	V, D ^c	Raw milk soft cheese ^d	1.0×10^4	Negative	S
6	1983	NK/NK/NK	NK	NK	Meat	NK	ND	S
7 ^b	1985	7/2/0	4–5 h	V, D	Soft cheese	3.0×10^8	SEB	C
8 ^b	1985	NK/3/0	2 h	V, D	Soft cheese	3.0×10^7	SEB	C
9	1986	NK/NK/NK	NK	NK	Sheep's milk cheese	1.0×10^6	SEB	C
10	1987	NK/NK/NK	NK	NK	Cake	5.0×10^7	SEA	C
11	1988	70/20/1	3–4 h	AP, V, D ^c	Spaghettis	3.0×10^8	SEA	C
12	1989	NK/3/0	2–3 h	V, D	Chicken ^d	1.5×10^6	ND	C
13	1992	32/NK/13	2 h	AP, V, D ^c	Potato and rice salads	5.0×10^9	SEA	C
14	1997	NK/NK/NK	NK	NK	Nougatine	2.0×10^3	Negative	S
15	1997	87/43/10	NK	NK	Raw milk cheese	1.0×10^7	+	C
16	1998	47/NK/15	3 h	AP, V, D ^c	Raw milk cheese	3.0×10^7	+	C
17	1998	17/10/10	NK	AP, V	Raw milk semi-hard cheese ^d	5.7×10^6	Negative	C
18	1999	NK/70/25	3–4 h	NK	Chocolate milk	7.6×10^2	SEA	C
19	2000	160/NK/80	NK	NK	Mixed salad	High	SEC	C
20	2000	NK/NK/NK	NK	NK	Raw sheep's milk cheese	2.6×10^4	SEA	C
21	2000	NK/4/2	3 h	V, D	Sliced pork	1.8×10^6	SEA, SED	C
22	2001	2/2/NK	1 h	V, D	Rice ^c	2.9×10^4	Negative	S
23	2001	21/9/1	2–4 h	AP, V	Pancakes	1.5×10^6	SEA	C
24 ^b	2001	NK/4/NK	3 h	V, D	Chocolate cake	1.0×10^4	SEA	C
25	2001	85/10/NK	NK	V	Cream	2.2×10^7	SEA	C
26 ^b	2001	6/5/5	3 h	N, AP, V	Roast lamb	3.0×10^7	SEA	C
27 ^b	2001	2/2/0	2 h	N, AP, V, D	Sliced soft cheese	$>1.5 \times 10^5$	SEA	C
28	2001	NK/NK/NK	NK	NK	Roasted pork	4.5×10^6	SED	C
29	2001	17/17/12	2 h	V	Raw milk semi-hard cheese ^d	2.9×10^4	SED ^f	S
30	2002	45/43/16	6 h	N, AP, V, D	Raw sheep's milk cheese	2.8×10^5	SEA	C
31	2002	NK/28/21	4 h	N, V, D	Rillettes (potted meat)	2.3×10^6	SEA	C

NK, not known; V, vomiting; D, diarrhoea; AP, abdominal pain; N, nausea; C, confirmed, or S, suspected, according to the criteria of Bryan et al. (1997).

^a Staphylococcal enterotoxins (SEA, SEB, SEC, SED) tested by radio-immunoassay until 1986, by ELISA after 1986; +, positive result using the global detection SEA-E Transia kit; ND, not determined.

^b Family outbreak.

^c One case notified with either severe prostration or state of shock or fainting or low blood pressure.

^d Strong epidemiological evidence implicating this food in SFPO.

^e *Bacillus cereus* not detected.

^f Result not confirmed by strain characterization.

2. Materials and methods

2.1. Source of bacterial isolates

A total of 178 coagulase-positive staphylococcal isolates were analyzed during investigation of 31 SFPO that occurred between 1981 and 2002 in various French cities of mainly two areas: Ile-de-France (12 SFPO) and Aquitaine (8 SFPO). Brief epidemiological information were collected for each SFPO (Table 1). Most of the isolates were from suspected food samples analyzed by AFSSA-Lerqap according to the standard methods AFNOR NF VO8-057 Part 1 or Part 2 which are based on the EN ISO methods 6888-1 and -2 for the enumeration of coagulase-positive staphylococci in foods (De Buyser et al., 2003). Various isolates from clinical or food samples were provided by other French laboratories.

2.2. Investigation of the phenotypes

Biotyping was carried out according to the simplified scheme (Devriese, 1984; Isigidi et al., 1990) which uses four discriminative tests: the production of staphylokinase and β -haemolysin, coagulation of bovine plasma within 6 h, and the type of growth on crystal violet agar. Phage-typing was performed and interpreted as previously described (Galdbart et al., 2000). Susceptibility to antimicrobial agents was tested by using the flooding technique (CA-SFM, 1996) on Mueller–Hinton agar plates (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) with commercially available disks (Bio-Rad) that contained penicillin G, cefoxitin, amoxicillin–clavulanic acid, tetracycline, minocycline, kanamycin, gentamicin, neomycin, tobramycin, spectinomycin, streptomycin, erythromycin, lincomycin, clindamycin, spiramycin, pristinamycin, pefloxacin, rifampin, fusidic acid, trimethoprim, chloramphenicol or fosfomycin, and with other disks prepared in-house with 20 μ g of pristinamycin II (SgA: A compound of the

pristinamycin association), 40 μ g of pristinamycin I (SgB: B compound of the pristinamycin association), 0.2 μ mol of cadmium acetate (Cd), 0.2 μ mol of sodium arsenate (As), 0.2 μ mol of mercuric nitrate (Hg), 200 μ g of ethidium bromide (EB), 200 μ g of propamidine isethionate (PI), or 200 μ g of acriflavine (AF). *In vitro* production of SEs A to D was examined by using the SET-RPLA kit (Oxoid, Dardilly, France).

2.3. Investigation of the genotypes

DNA samples were prepared using InstaGene™ Matrix (Bio-Rad) from few bacterial colonies. A GeneAmp PCR System 9700 thermocycler (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) was used for all PCR-based techniques. The nine primer pairs designed for PCR targeting genes *sea* to *sei* and 23S rRNA (Table 2) were purchased from Proligo (Paris, France). PCR assays contained 2.5 U of FastStart Taq DNA polymerase (Roche Diagnostics, Meylan, France), 1 \times buffer without MgCl₂, 100 μ M of each dNTP, 0.4 μ M of each primer and 2 μ l of DNA sample in a 50 μ l total reaction volume. Optimal concentrations of MgCl₂ were 4 mM for the detection of *sed* and 23S rRNA, and 2 mM for the other genes. All PCR series included a positive amplification control and a no-template control. Three thermal profiles were programmed according to the target genes (Table 2). Ten μ l aliquots of PCR assays were analyzed by 2% (w/v) agarose gel electrophoresis in 1 \times TBE buffer (Sambrook and Russell, 2001). Marker VI (Roche Diagnostics) was used as molecular mass standard.

Macrorestriction of the bacterial DNA was done as previously described (Hennekinne et al., 2003), and PFGE patterns were analyzed by the BioNumerics software (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium). Clonality of the strains was limited to undistinguishable *Sma*I patterns. Cluster analysis was performed using the Dice similarity coefficient and visualized as a dendrogram by UPGMA with 1% band tolerance and 1% optimization settings.

Table 2
Assay conditions of the gene amplification tests

Primers	Nucleotide sequence from 5' to 3'	Program ^a	Target	Size (bp)	Reference
SEA 1	TTGGAAACGGTTAAAACGAA	P1	<i>sea</i>	121	Johnson et al. (1991)
SEA 2	GAACCTCCCATCAAAAAACA				
SEB 1	TCGCATCAAACGTGACAAACG	P1	<i>seb</i>	477	
SEB 2	GCAGGTAATCTATAAGTGCC				
SEC 1	GACATAAAAGCTAGGAATTT	P2	<i>sec</i>	257	
SEC 2	AAATCGGATTAACATTATCC				
SED 1	CTAGTTTGGTAATATCTCCT	P2	<i>sed</i>	318	
SED 2	TAATGCTATATCTTATAGGG				
SEE 1	TAGATAAAGTTAAAACAAGC	P1	<i>see</i>	169	
SEE 2	TAACCTACCGTGGACCCTTC				
SEG 1	TGCTATCGACACTACAACC	P1	<i>seg</i>	704	McLauchlin et al. (2000)
SEG 2	CCAGATTCAAATGCAGAACC				
SEH 1	CGAAAGCAGAAGATTTACACG	P1	<i>seh</i>	495	
SEH 2	GACCTTACTTATTTTCGCTGTC				
SEI 1	GACAACAAAACGTGCGAAAACG	P1	<i>sei</i>	630	
SEI 2	CCATATTCTTTGCCTTTACCAG				
STAUR-4	ACGGAGTTACAAAGGACGAC	P3	23S rRNA	1250	Straub et al. (1999)
STAUR-6	AGCTCAGCCTTAACGAGTAC				

^a Thermal cycling: P1, 1 \times (3 min at 94 °C) 35 \times (30 s at 94 °C–30 s at 60 °C–45 s at 72 °C) 1 \times (7 min at 72 °C); P2, 1 \times (3 min at 94 °C) 35 \times (30 s at 94 °C–30 s at 55 °C–45 s at 72 °C) 1 \times (7 min at 72 °C); P3, 1 \times (3 min at 94 °C) 35 \times (30 s at 94 °C–30 s at 65 °C–90 s at 72 °C) 1 \times (7 min at 72 °C).

3. Results and discussion

3.1. Identification and biotyping

A total of 178 coagulase-positive staphylococcal isolates were biotyped. The 33 strains representative of the different biotype profiles detected for each SFPO were all identified as *S. aureus* by a species-specific 23S rDNA-targeted PCR test. Only profiles attributed to human biotypes were observed for 26/31 (83.9%) SFPO whereas only profiles attributed to ovine or non-host-specific biotypes were observed for the remaining five (16%) SFPO (Table 3). A human biotype is expected in SFPO but this is the first report demonstrating the involvement of non-human biotypes in three SFPO and suspecting them in a further two. The non-human biotypes strains were all isolated from raw milk cheeses where they are more fre-

quently found than human biotype strains (De Buyser and Lapeyre, 1994).

3.2. Phage-typing

Out of 30 tested strains (Table 3), three (10%) strains were not typable. Most (74.1%) of the 27 typable strains were recognised by phages in group III of the international set as usually observed (McLauchlin et al., 2000; Shimizu et al., 2000) and most (70.4%) were also recognised by experimental phages that can be used to type European methicillin-resistant clonal lineages.

3.3. Drug-resistance

We tested for resistance to antibiotics, heavy metal salts (Cd, As, Hg), and cationic biocides (PI, AF, EB). Only two strains

Table 3
Analysis of the 33 *S. aureus* strains from the 31 food poisoning outbreaks

Outbreak	No. (source ^a) of isolates	Biotype ^b	Resistance to ^c	Phage group ^d	PFGE pattern	PCR ^e	RPLA ^f
1	1 (fd)	Human	PEN, Cd, As	III/NC/exp	p7	<i>sea, sed</i>	SEA, SED
2	2 (fd)	Human	Cd, As	III	p24	<i>sea, seh</i>	SEA
3	2 (fd)	Human	PEN, STR, Cd, As	III/exp	p6	<i>sea, sed</i>	SEA, SED
4	1 (fd)	Human	Cd, As	III/exp	p5	<i>sea, seh</i>	SEA
5	2 (fd)	NHS4	PEN	I/III/NC/exp	p29	Negative	Negative
6	1 (fd)	Human	PEN, Cd	III/exp	p23	<i>sea, sed</i>	SEA, SED
7	13 (fd)	Human	PEN, MLSi, Cd	V	p12	<i>sea, seb, seg, sei</i> ^g	SEA, SEB, SED
8	3 (fd)	Human	PEN, MLSi, Cd	V	p32	<i>seb, seg, sei</i>	SEB
9	1 (fd)	Human	PEN	V	p3	<i>seb, seg, sei</i>	SEB
10	2 (fd)	Human	Cd, As	III/exp	p22	<i>sea</i>	SEA
11	1 (fd)	Human	PEN, TET, MIN	exp	p19	<i>sea, seg, sei</i>	SEA
12	1 (fd)	Human	Susceptible	NC	p39	<i>sec, seg, sei</i>	SEC
13	2 (fd), 1 (ic)	Human	PEN, FUS, Cd	I/III/NC/exp	p16	<i>sea</i>	SEA
14	10 (fd)	Human	MLSi, Cd	exp	p50	<i>sea, seh</i>	SEA
15	10 (fd)	Human	Cd, As, Hg	III/exp	p45	<i>sea, sed</i>	SEA, SED
16	24 (fd)	Human	Cd, As, AF, EB	III/exp	p45	<i>sea, sed</i>	SEA, SED
17	12 (fd)	NHS3	PEN, Cd, As	I/III/NC/exp	p1	Negative	Negative
18	9 (fd), 2 (fc)	Human	PEN, MLSi, Cd, EB	III	p4	<i>sea, seh</i>	SEA
19	25 (fd), 2 (fc)	Human	TET, Cd, As	I/III/NC/exp	p8	<i>sec</i>	SEC
20	7 (fd)	Ovine	PEN, STR, Cd	NT	p9	Negative ^g	SEA
21	3 (fd), 2 (fc)	Human	MET, KAN, TOB, NEO, LSgA, PEF, Cd, As	III/exp	p2	<i>sea, sed</i>	SEA, SED
22	1 (fd)	Human	TET, Cd, EB	NT	p47	Negative	Negative
23-a	3 (fd)	Human	MET, KAN, TOB, NEO, PEF, FUS, Cd, As, Hg	III/exp	p26	<i>sea, sed</i>	SEA, SED
23-b	2 (fd)	Human	PEN, Cd, As, Hg	I	p21	<i>sea, sed, seg, sei</i>	SEA, SED
24	2 (fd)	Human	Cd, As, EB	III	p25	<i>sea, sed</i>	SEA, SED
25	1 (fd)	Human	PEN, FUS, Cd, As, Hg	III/exp	p35	<i>sea</i>	SEA
26	6 (fd)	Human	PEN, FUS, Cd, As, AF, EB	III/exp	p28	<i>sea</i>	SEA
27	4 (fd)	Human	PEN, Cd, As	III/exp	p27	<i>sea, sed</i>	SEA, SED
28	6 (fd)	Human	PEN, Cd, EB	I/III/NC/exp	p11	<i>sed, seg, sei</i>	SED
29-a	5 (fd)	NHS6	AF, EB	NT	p10	<i>seg, sei</i>	Negative
29-b	1 (fd)	NHS3	STR	ND	p46	Negative	Negative
30	5 (fd)	Ovine	Susceptible	ND	p44	<i>sea</i>	SEA
31	3 (fd)	Human	TET	ND	p31	<i>sea, seh</i>	SEA

^a fd, food; fc, faeces; ic, infected cook.

^b NHS3, NHS4, and NHS6 are non-host-specific profiles described in Hennekinne et al. (2003). Two distinct human profiles were observed in outbreak 23.

^c Cd, cadmium; As, arsenate; Hg, mercury; EB, ethidium bromide; STR, streptomycin; PEN, penicillin G; MLSi, macrolide–lincosamide–streptogramin B inducible; KAN, kanamycin; TOB, tobramycin; NEO, neomycin; FUS, fusidic acid; TET, tetracycline; LSgA, lincomycin–streptogramin A; PEF, pefloxacin; MET, methicillin; MIN, minocycline; AF, acriflavine.

^d exp, experimental; NT, not typable; ND, not determined.

^e Tested for genes *sea, seb, sec, sed, see, seg, seh, sei*.

^f Tested for SEA, SEB, SEC and SED.

^g Variant *se* genes *sed_v* (outbreak 7) and *sea_v* (outbreak 20) detected by real-time PCR (Letertre et al., 2003b).

were susceptible to all the agents tested whereas 21/33 (63.6%) of the strains were resistant to three or more (Table 3). However, the strains cannot be categorized as antibiotic multiresistant: 11 were resistant to at least two classes of antibiotics, and two of these, resistant to methicillin, displayed true and classical multiresistance profile. Cadmium resistance was the most frequent trait (75.8%), followed by resistance to penicillin (57.6%) and resistance to arsenate (48.5%). Resistance to cationic biocides was infrequent (21.2%) and only three strains were resistant to acridines. With reference to human clinical isolates, the SFPO strains were more susceptible to antibiotics (except for two which were resistant to methicillin). Half of the strains, including those resistant to methicillin, were co-resistant to penicillin and cadmium. This combined resistance is probably plasmid-mediated but the gene responsible for penicillin resistance, *blaZ*, can in some cases be found on the *S. aureus* chromosome (Lindsay and Holden, 2004). We are currently investigating the genetic basis of the resistance expressed by the SFPO strains. Little is known about antimicrobial resistance of food *S. aureus* (Kaszanyitzky et al., 2003). However, Kitai et al. (2005) have recently described two

methicillin-resistant *S. aureus* strains isolated from raw chicken meat and showing the characteristics of community-associated human isolates. As shown in our study, antibiotic resistance testing is not suitable as a typing method for SFPO strains, but resistance is a public health concern because humans can be infected by multiresistant bacteria present in food.

3.4. SE production and *se* genes

The production of SEs *in vitro* was studied by RPLA. The findings were compared with the results of amplification of the *se* genes by PCR. There was a complete agreement between the two methods for 31 (93.9%) of the 33 strains (Table 3). The two strains giving discrepant results were further tested by a real-time PCR method (Letertre et al., 2003b) using primers distinct from those used in this study (Table 2) and the results obtained were consistent with those obtained using RPLA: the strain from outbreak 7 carried a variant *sed* gene and the strain from outbreak 20, a variant *sea* gene. Therefore, 33/33 (100%) RPLA results were concordant with the presence of *sea* to *sed* genes, including these two variant genes. Of the 33 strains, 29

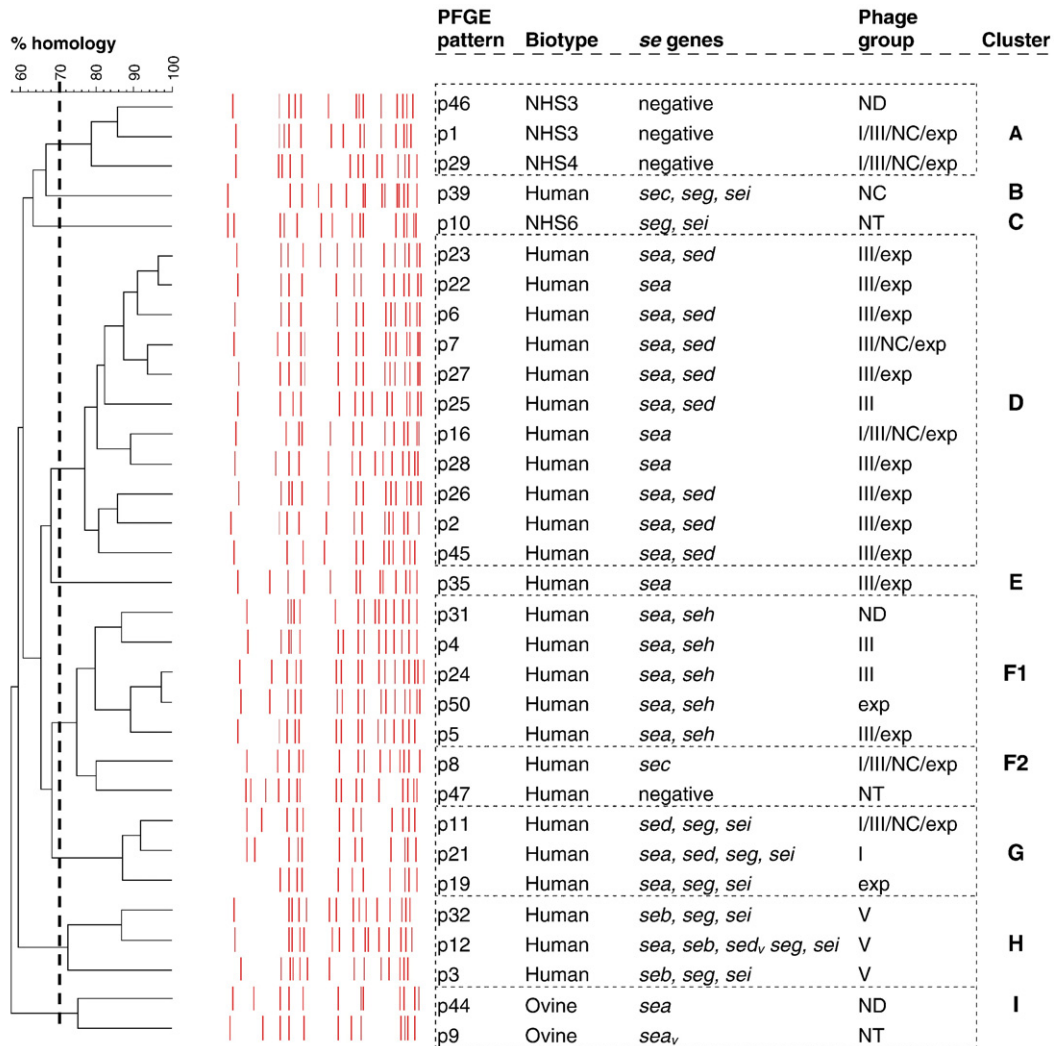


Fig. 1. Dendrogram showing the genetic relatedness among the 32 PFGE patterns. NHS, non-host specific; ND, not determined; NT, not typable; *se_v*, variant *se* gene.

(87.9%) carried one or several *se* genes and four (12.1%) carried no *sea* to *sei* genes. The most frequent gene was *sea* ($n=23$) followed by *sed*, *seg*, *sei*, and *seh*. The genes *seb* and *sec* were less frequent, and *see* was not found. The most frequent *se* gene profiles were *sea–sed* ($n=9$), *sea* alone ($n=6$), and *sea–seh* ($n=5$). The genes *seg* and *sei* ($n=8$) were in all cases associated but only one strain carried them without any other genes. Except for this last strain, the novel *se* genes, *seg*, *seh* and *sei*, were in all cases associated with classical *se* genes. Our results show that the *sea* gene is dominant and often associated with *sed* or *seh* in *S. aureus* strains linked to SFPO in France. In Korea, the *sea* gene was also dominant and frequently associated with *seh* or *seg–sei* in strains linked to 40 SFPO studied from 1990 to 2002 (Cha et al., 2006). In Japan, the predominant SEs produced by *S. aureus* strains from 129 SFPO were SEA, SEA-SEB and SEB (Shimizu et al., 2000). Thus, SFPO attributed to ingestion of SEA are the most frequent worldwide but other SEs including novel SEs may be involved together with SEA. The involvement of SEH in SFPO now appears to be well established since it was recently detected in food products responsible for two outbreaks (Ikeda et al., 2005; Jorgensen et al., 2005a), however, the involvement of SEG and SEI is not yet clearly established (Omoe et al., 2002). Surprisingly, the two ovine strains were SEA producers despite most ovine biotype strains and isolates from caprine bulk milk being SEC producers (De Buyser et al., 1987; Jorgensen et al., 2005b). The *sea* gene was not detected in 191 animal-associated *S. aureus* strains including 23 strains isolated from sheep (Smith et al., 2005). However, Scherrer et al. (2004) found that 9.6% of 293 *S. aureus* isolates from caprine and ovine bulk milk possessed the *sea* gene. Although not frequent, we show that *sea*-harbouring strains of ovine biotype can be involved in SFPO. The four *se*-negative clones should be tested for known *se* genes and other superantigen toxin (Sag) genes not included in this study. If negative, their superantigenic activity should be tested to assess the possible involvement of currently unknown SEs. Smith et al. (2005) tested 45 bovine *S. aureus* isolates that were Sag gene negative, and found that four of them were mitogenic for human T cells, suggesting that they carry uncharacterized Sags, possibly including SEs. Three of our four SE-negative clones were isolated from raw milk cheeses involved in SFPO, and belong to unspecified biotypes; therefore it is possible that they produce unidentified SEs.

3.5. PFGE patterns

All strains were typable by the PFGE method. *Sma*I digestion of *S. aureus* chromosomal DNA produced 11 to 17 fragments of between 30 and 700 kb (Fig. 1). The overall similarity was 57.48%. Every outbreak gave a different PFGE pattern, except for outbreaks # 15 and 16 (PFGE pattern p45). The same type of cheese produced by the same plant was involved in outbreaks # 15 and 16, and therefore, the same clone could have been involved in the two outbreaks separated by only one year. PFGE patterns p24 from outbreak # 2 and p50 from outbreak # 14 shared 97% similarity; however, these two outbreaks were temporally and geographically distant and the phage groups and

resistance profiles observed for these strains were also different. This study underlines the highly discriminatory power of PFGE as a typing approach since our PFGE patterns were SFPO-specific. Although other methods such as multilocus sequence typing are now available, PFGE remains among the most discriminating typing methods for *S. aureus* strains (Peacock et al., 2002; Jorgensen et al., 2005b; Cha et al., 2006).

Using a 70% similarity cut-off, the strains were grouped into nine clusters, designated by the letters A to I. No link was found between PFGE clusters and phage groups, except for cluster I which contained all three strains lysed by group V phages and these findings agree with those of Hennekinne et al. (2003) and Shimizu et al. (2000). However, we confirmed our previous observation (Hennekinne et al., 2003) about the strong correlation between PFGE pattern and biotype. Moreover, all isolates within some of the PFGE clusters had the same *se*-gene profiles, as previously described (Jorgensen et al., 2005b). Interestingly, cluster A included strains of NHS biotypes in which none of the *se* genes tested were detected. Cluster I included the two *sea*-harbouring strains of ovine biotype. All the five strains carrying *sea* and *seh* were grouped into a single sub-cluster, as already observed by Cha et al. (2006). Cluster G grouped strains carrying *seg* and *sei* genes associated with *sea* and/or *sed* genes.

In conclusion, PFGE was a highly valuable technique for tracing *S. aureus* strains associated with SFPO and describing their clonal relationships. Moreover, PFGE clusters did correlate with biotypes and *se*-gene profiles. Human biotype strains were involved in a majority (84%) of the 31 SFPO studied but, for the first time, involvement of ovine and non-host-specific biotypes was demonstrated or suspected in 16% of the SFPO. The *sea* gene was predominant and often associated with *sed* or *seh* in our SFPO strains. A great susceptibility to antibiotics is a common characteristic of these strains except for two of them which were resistant to methicillin.

Acknowledgements

We acknowledge the technical assistance of Trinh Tam Dao, Marie-Odile Delbart, Muriel Marault, and Anne Morvan. We dedicate this paper to the memory of N  vine El Solh who contributed to the phage-typing and who passed away in January 2005.

References

- Bonnetain, F., Carbonel, S., Stoll, J., Legros, D., 2003. Toxi-infection alimentaire collective due   *Staphylococcus aureus*, Longeville-sur-le-Doubs, juillet 2003. Bull. Epid miol. Hebd. 47, 231–232.
- Bryan, F.L., Guzewich, J.J., Todd, E.C.D., 1997. Surveillance of foodborne disease II. Summary and presentation of descriptive data and epidemiologic patterns; their value and limitations. J. Food Prot. 60, 567–578.
- CA-SFM, 1996. Technical recommendations for *in vitro* susceptibility testing. Clin. Microbiol. Infect. 2 (Suppl. 1), 11–25.
- Cha, J.O., Lee, J.K., Jung, Y.H., Yoo, J.I., Park, Y.K., Kim, B.S., Lee, Y.S., 2006. Molecular analysis of *Staphylococcus aureus* isolates associated with staphylococcal food poisoning in South Korea. J. Appl. Microbiol. 101, 864–871.
- Chiou, C.S., Wei, H.L., Yang, L.C., 2000. Comparison of pulsed-field gel electrophoresis and coagulase gene restriction profile analysis techniques in

- the molecular typing of *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol. 38, 2186–2190.
- De Buyser, M.L., Lapeyre, C., 1994. Mammites   staphylocoques et sécurité alimentaire. Le Point Vétérinaire, vol. 26, pp. 79–82. num ro sp cial « ruminants et santé publique ».
- De Buyser, M.L., Dilasser, F., Hummel, R., Bergdoll, M.S., 1987. Enterotoxin and toxic shock syndrome toxin-1 production by staphylococci isolated from goat's milk. Int. J. Food Microbiol. 5, 301–309.
- De Buyser, M.L., Lombard, B., Schulten, S.M., In't Veld, P.H., Scotter, S.L., Rollier, P., Lahellec, C., 2003. Validation of EN ISO standard methods 6888 Part 1 and Part 2: 1999—enumeration of coagulase-positive staphylococci in foods. Int. J. Food Microbiol. 83, 185–194.
- Delmas, G., Le Querrec, F., Weill, F.-X., Gallay, A., Espié, E., Haeghebaert, S., Vaillant, V., 2005. Les Toxi-Infections Alimentaires, Surveillance nationale des Maladies Infectieuses 2001–2003. Institut de veille sanitaire, France.
- Devriese, L.A., 1984. A simplified system for biotyping *Staphylococcus aureus* strains isolated from different animal species. J. Appl. Bacteriol. 56, 215–220.
- Galdbart, J.O., Morvan, A., El Solh, N., 2000. Phenotypic and molecular typing of nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains susceptible to gentamicin isolated in France from 1995 to 1997. J. Clin. Microbiol. 38, 185–190.
- Hennekinne, J.A., Kérouanton, A., Brisabois, A., De Buyser, M.L., 2003. Discrimination of *Staphylococcus aureus* biotypes by pulsed-field gel electrophoresis of DNA macro-restriction fragments. J. Appl. Microbiol. 94, 321–329.
- Hennekinne, J.A., Guillier, F., P relle, S., De Buyser, M.L., Dragacci, S., Krys, S., Lombard, B., 2006. Intralaboratory validation according to the EN ISO 16140 standard of the Vidas SET2 detection kit for use in official controls of staphylococcal enterotoxins in milk products. J. Appl. Microbiol. doi:10.1111/j.1365-2672.2006.03183.x (Published article online: 17-Oct-2006).
- Ikeda, T., Tamate, N., Yamaguchi, K., Makino, S., 2005. Mass outbreak of food poisoning disease caused by small amounts of staphylococcal enterotoxins A and H. Appl. Environ. Microbiol. 71, 2793–2795.
- Isigidi, B.K., Devriese, L.A., Godard, C., Van Hoof, J., 1990. Characteristics of *Staphylococcus aureus* associated with meat products and meat workers. Lett. Appl. Microbiol. 11, 145–147.
- Jablonski, L.M., Bohach, G.A., 2001. *Staphylococcus aureus*. In: Doyle, M.P., Beuchat, L.R., Montville, T.J. (Eds.), Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers, 2nd ed. ASM Press, Washington, D.C., USA, pp. 411–434.
- Johnson, W.M., Tyler, S.D., Ewan, E.P., Ashton, F.E., Pollard, D.R., Rosee, K.R., 1991. Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. 29, 426–430.
- Jorgensen, H.J., Mathisen, T., Lovseth, A., Omoe, K., Qvale, K.S., Loncarevic, S., 2005a. An outbreak of staphylococcal food poisoning caused by enterotoxin H in mashed potato made with raw milk. FEMS Microbiol. Lett. 252, 267–272.
- Jorgensen, H.J., Mork, T., Caugant, D.A., Kearns, A., Rorvik, L.M., 2005b. Genetic variation among *Staphylococcus aureus* strains from Norwegian bulk milk. Appl. Environ. Microbiol. 71, 8352–8361.
- Kaszanyitzky, E.J., J nosi, S., Egyed, Z., Agost, G., Semj n, G., 2003. Antibiotic resistance of staphylococci from humans, food and different animal species according to data of the Hungarian resistance monitoring system in 2001. Acta Vet. Hung. 51 (4), 451–464.
- Kitai, S., Shimizu, A., Kawano, J., Sato, E., Nakano, C., Uji, T., Kitagawa, H., 2005. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from retail raw chicken meat in Japan. J. Vet. Med. Sci. 67, 107–110.
- Letertre, C., Perelle, S., Dilasser, F., Fach, F., 2003a. Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by the *egc* cluster of *Staphylococcus aureus*. J. Appl. Microbiol. 95, 38–43.
- Letertre, C., Perelle, S., Dilasser, F., Fach, F., 2003b. A strategy based on 5' nuclease multiplex PCR to detect enterotoxin genes *sea* to *sej* of *Staphylococcus aureus*. Mol. Cell. Probes 17, 227–235.
- Lina, G., Bohach, G.A., Nair, S.P., Hiramatsu, K., Jouvin-Marche, R., Mariuzza, R., 2004. Standard nomenclature for the superantigens expressed by *Staphylococcus*. J. Infect. Dis. 189, 2334–2336.
- Lindsay, J.A., Holden, M.T., 2004. *Staphylococcus aureus*: superbug, super-genome? Trends Microbiol. 12, 378–385.
- Martin, M.C., Fueyo, J.M., Gonzalez-Hevia, M.A., Mendoza, M.C., 2004. Genetic procedures for identification of enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* from three food poisoning outbreaks. Int. J. Food Microbiol. 94, 279–286.
- McLaughlin, J., Narayanan, G.L., Mithani, V., O'Neill, G., 2000. The detection of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin genes in *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. J. Food Prot. 63, 479–488.
- Omoe, K., Ishikawa, M., Shimoda, Y., Hu, D.L., Ueda, S., Shinagawa, K., 2002. Detection of *seg*, *seh*, and *sei* genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of the enterotoxin productivities of *S. aureus* isolates harbouring *seg*, *seh*, or *sei* genes. J. Clin. Microbiol. 40, 857–862.
- Peacock, S.J., de Silva, G.D., Justice, A., Cowland, A., Moore, C.E., Winearls, C.G., Day, N.P., 2002. Comparison of multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis as tools for typing *Staphylococcus aureus* isolates in a microepidemiological setting. J. Clin. Microbiol. 40, 3764–3770.
- Sambrook, J., Russell, D.W., 2001. Molecular Cloning — a Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Scherrer, D., Corti, S., Muehlherr, J.E., Zweifel, C., Stephan, R., 2004. Phenotypic and genotypic characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from bulk-tank milk samples of goats and sheep. Vet. Microbiol. 101, 101–107.
- Shimizu, A., Fujita, M., Igarashi, H., Takagi, M., Nagase, N., Sasaki, A., Kawano, J., 2000. Characterisation of *Staphylococcus aureus* coagulase Type VII isolates from staphylococcal food poisoning outbreaks (1980–1995) in Tokyo, Japan, by pulsed-field gel electrophoresis. J. Clin. Microbiol. 38, 3746–3749.
- Smith, D.S., Hartigan, P.J., Meaney, W.J., Fitzgerald, J.R., Deobald, C.F., Bohach, G.A., Smith, C.J., 2005. Superantigen genes encoded by the *egc* cluster and SaPIbov are predominant among *Staphylococcus aureus* isolates from cows, goats, sheep, rabbits and poultry. J. Med. Microbiol. 54, 401–411.
- Straub, J.A., Hertel, C., Hammes, W.P., 1999. A 23S rDNA-targeted polymerase chain reaction-based system for detection of *Staphylococcus aureus* in meat starter culture and dairy products. J. Food Prot. 62, 1150–1156.
- Thomas, D.Y., Jarraud, S., Lemercier, B., Cozon, G., Echasserieu, K., Etienne, J., Gougeon, M.L., Lina, G., Vandenesch, F., 2006. Staphylococcal enterotoxin-like toxins U2 and V, two new staphylococcal superantigens arising from recombination within the enterotoxin gene cluster. Infect. Immun. 74 (8), 4724–4734.

5. Hennekinne J-A., Guillier F., Perelle S., De Buyser M.L., Dragacci S., Lombard B., Krys S. (2007). Intra laboratory validation of the Vidas SET2 detection kit in milk products according to the EN ISO 16 140 standard. *J. Appl. Microbiol.* 102, 1261–1272.

ORIGINAL ARTICLE

Intralaboratory validation according to the EN ISO 16 140 Standard of the Vidas SET2 detection kit for use in official controls of staphylococcal enterotoxins in milk products

J.-A. Hennekinne, F. Guillier, S. Perelle, M.-L. De Buyser, S. Dragacci, S. Krysz and B. Lombard

Laboratory for Study and Research on Quality of Food and on Food Processes, French Agency for Food Safety (AFSSA-lerqap), National and Community Reference Laboratory, 94704 Maisons-Alfort cedex, France

Keywords

enterotoxin, immunological-based method, milk product, naturally contaminated sample, *Staphylococcus aureus*.

Correspondence

Jacques-Antoine Hennekinne, Laboratory for Study and Research on Quality of Food and on Food Processes, French Agency for Food Safety (AFSSA-lerqap), National and Community Reference Laboratory for coagulase positive staphylococci including *Staphylococcus aureus*, 23 avenue du Général de Gaulle, 94704 Maisons-Alfort cedex, France.
E-mail: ja.hennekinne@afssa.fr

2006/0181: received 9 February 2006, revised 4 May 2006 and accepted 1 September 2006

doi:10.1111/j.1365-2672.2006.03183.x

Abstract

Aim: Immunological tools used to detect staphylococcal enterotoxins (SEs) in foods are numerous. The aim of this study was to evaluate, on naturally contaminated milk product samples, the performance of the Vidas SET2, in comparison to the Transia plate SET.

Methods and Results: The Vidas SET2 was compared with the Transia plate SET on supernatants of *Staphylococcus aureus* isolates and on naturally contaminated milk products. It is noteworthy that when using IgG rabbit treatment, both kits can be considered as equivalent to detect enterotoxins in naturally contaminated milk products.

Conclusions: This study demonstrated that the Vidas SET2 performance is similar to that of Transia plate SET kit, when a rabbit IgG treatment step is used before detection step. This additional treatment significantly decreased, from 42% to 8%, the rate of positive deviations observed using the Transia plate SET detection kit.

Significance and Impact of the Study: The Vidas SET2 was clearly found as more specific, when no preliminary rabbit IgG treatment was used, and which results in a better workflow when a large number of samples have to be analysed within a few days. Considering the results obtained, the Vidas SET2 detection kit can be used to assess the safety of milk products for SEs.

Introduction

Staphylococcal food poisoning is one of the most common food-borne diseases resulting from the ingestion of staphylococcal enterotoxins (SEs) preformed in foods by enterotoxigenic strains of coagulase-positive staphylococci (CPS), mainly *Staphylococcus aureus*. Dairy products may be involved in such outbreaks because of the occurrence of CPS in this type of food (http://www.europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scv/out61_en.pdf) (Anon 2003a). Various CPS biotypes are found in milk, but animal biotypes are more frequently encountered than human biotypes. A total of 60–80% of CPS strains from sheep and goats are toxigenic, most of which produce enterotoxin type C (SEC). For cow's milk, 9–60% of bovine CPS strains are

estimated to produce SEC usually in combination with the *tst* gene (Zschock *et al.* 2004; Katsuda *et al.* 2005). To our knowledge, 20 enterotoxins and/or enterotoxin-like types have been identified – enterotoxins A (SEA), B (SEB), C₁ (SEC₁), C₂ (SEC₂), C₃ (SEC₃), D (SED), E (SEE), G (SEG), H (SEH), I (SEI), J (SEIJ) (Balaban and Rasooly 2000), K (SEIK) (Orwin *et al.* 2001), L (SEIL), M (SEIM), N (SEIN), O (SEIO) (Jarraud *et al.* 2001), P (SEIP) (Omoe *et al.* 2005), Q (SEIQ) (Orwin *et al.* 2002), R (SEIR) (Omoe *et al.* 2003) and U (SEIU) as an open-reading frame of the *egc* cluster encoding an enterotoxin-like (Letertre *et al.* 2003a).

Strains isolated from staphylococcal food poisoning outbreaks (SFPO) mainly produce SEA, and, to a lesser extent, SED, SEB and SEC. SEA is responsible for 75% of

SFPO in developed countries (Normanno *et al.* 2005), followed by SED, SECs and SEB (Jablonski and Bohach 1997). Outbreaks associated with SEE and SEH are rarely reported. However, two recent epidemiological studies reported SFPO because of ingestion of SEH (Ikeda *et al.* 2005; Jorgensen *et al.* 2005). The other toxin types (SEI to SEIU) have been identified so far at the genetic level and their expression in food products is not well documented (Mac Lauchlin *et al.* 2000; Omoe *et al.* 2002; Rosec and Gigaud 2002; Letertre *et al.* 2003a; Loncarevic *et al.* 2005).

A recent epidemiological study reported a toxic dose of about 40 ng of SEA- and SEH-induced symptoms such as vomiting and diarrhoea (Ikeda *et al.* 2005).

Detection of SEs in foods is often difficult because of the small SE amounts present in foods and their proteic nature. Three types of methods are usually used to detect bacterial toxins in food: bioassays, molecular biology and/or immunological tools.

Bioassays

Bioassays are based on the capacity of the food extract to induce symptoms, such as vomiting, gastrointestinal symptoms in animals and/or superantigenic action on cell cultures. Historically, SEs were detected by their emetic activity in monkey-feeding and kitten-intraperitoneal tests (Surgalla *et al.* 1953; Bergdoll 1970). Symptoms of staphylococcal food poisoning appear if the dose ingested by the animals is above 200 ng, amounts higher than those involved in human food poisoning (Asao *et al.* 2003; Ikeda *et al.* 2005). Thus, besides the use of laboratory animals being restricted for ethical reasons, these bioassays are not sensitive enough to ensure food safety for consumers. More recently, a superantigen bioassay to detect SEA has been developed by Hawryluk and Hirshfield (2002). This method is a bioassay that exploits SEA's activity as a superantigen in that it induces in cytotoxic T lymphocytes a cytotoxic response against SEA-bound Raji cells. The death of target cells is assessed colorimetrically with the CytoTox 96 cell lysis detection kit (Promega, Charbonnières, France). This bioassay is also able to detect heat-treated SEA, albeit with a slight compromise in sensitivity. This system, detecting SEA at picomolar concentrations, is restricted to one of the SE types and is quite difficult to assign to the laboratories involved in official controls.

Molecular assays

Methods based on molecular biology often involve a polymerase chain reaction (PCR). The technique detects genes encoding for enterotoxins in isolates of *Staph. aureus* isolated from contaminated foods. PCR has two

major problems: first, staphylococcal isolates should be isolated from foods and, secondly, this method gives an indication of the presence or absence of genes encoding for SEs, but in fact, no information on the expression of these genes during food production. This method is therefore not suitable by itself for the detection of SEs in foods. However, it allows the characterization of the *Staph. aureus* isolates involved in food-poisoning outbreaks. The frequency of the *Staph. aureus* isolates harbouring newly described genes (*seg*, *seh*, *sei*, *selj*) involved in SFPO in France is high (57%) and greater than the frequency of isolates harbouring 'classical' SE genes – from *sea* to *see* (Rosec and Gigaud (2002)). When considering the newly described SE genes, in addition to the classical SE genes, the percentage of food-borne enterotoxigenic *Staph. aureus* isolates is doubled. The *Staph. aureus* biovars that were rarely or never demonstrated as enterotoxigenic (i.e. the poultry and bovine biovars) frequently become more toxigenic, taking into account the *seg*, *seh*, *sei* and *selj* genes.

Immunological assays

The third type of method and the most used for the detection of SEs in foods are based on the use of specific polyclonal or monoclonal antibodies (Mabs) against the enterotoxins. Commercially available kits have been developed according to three different principles: ELISA, enzyme linked fluorescent assay (ELFA) and reverse passive latex agglutination (RPLA). Some of these tests are able to differentiate only six or seven types of SEs (SEA, SEB, SEC₁, SEC₂, SEC₃, SED and/or SEE), while the others do not differentiate them. None of them are able to detect other SEs (from SEH to SEIU), but those toxin forms may possibly cross-react with known antibodies raised against 'classical' SEs.

The European screening method for the detection of SEs in milk and milk products was previously selected and characterized by the Community Reference Laboratory (CRL): the protocol of the European screening method mainly includes two steps (i) extraction and concentration by dialysis and (ii) detection by an enzyme immuno-assay (EIA). Before the detection step, it has been shown that the food extract has to be concentrated to detect low amounts of SEs in foods (Macaluso *et al.* 1998). Following (i) a comparative study performed on the commercially available kits for SEs detection and (ii) an international interlaboratory study (Lapeyre *et al.* 1996), the Transia plate SET detection kit has been validated. Thus, it was decided to use this kit to perform official controls in all the EU member states. However, some pitfalls, such as cross-reactions leading to false-positive and/or false-negative results, still occur. In the event of a

false-positive result, the food producer has to withdraw products from the market leading to economical losses. In the case of a false-negative result, the consumer is clearly exposed to a toxin hazard. Thus, it is crucial to progress and develop rapid, reliable and sensitive methods for official controls.

This study was planned to evaluate the performances of one commercially available immunological tool, the Vidas SET2 (bio Mérieux, Marcy l'étoile, France), for milk and milk products in comparison with the official European screening method and the CRL confirmatory method according to the Standard EN ISO 16140 (Anon 2003b). Before performing studies on milk products, the specificities of the Transia plate SET and the Vidas SET2 were tested on supernatants of characterized *Staph. aureus* strains; this characterization being performed by PCR and by the SET-RPLA.

Materials and methods

Characterization of coagulase-positive staphylococci strains

A total of 46 isolates of *Staph. aureus* (Table 1), isolated from various food suspected to be involved in food poisoning outbreaks, were characterized as follows: each isolate was cultivated in brain heart infusion, overnight at 37°C, before PCR detection of *sea* to *selu* genes as previously described by Letertre *et al.* (2003b)). All isolates were tested for the production of enterotoxins by (i) the SET-RPLA kit (Oxoid, Dardilly, France), (ii) the Transia plate SET (Diffchamb S.A., Lyon, France) detection kit, (iii) the Vidas SET2 (bioMérieux, Marcy l'étoile, France) detection kit and (iv) the CRL confirmatory method: a quantitative indirect sandwich-type ELISA previously developed in our laboratory (Lapeyre *et al.* 1988).

Milk product samples

A total of 62 milk and milk-based product samples received in our laboratory in the frame of national official controls for SE detection were used for the intralaboratory validation study. These samples were analysed with or without a previous rabbit plasma treatment indicated for avoiding a possible interference by protein A. Samples included (i) a cake (1), (ii) liquid milk (2), (iii) cheeses made from cow's milk (32), goat's milk (17), ewe's milk (7) and cheeses made with unspecified milk (3). The characteristics of these samples are given in Table 2. All of them have been submitted to a protein extraction step using dialysis concentration, as it is recommended in the European screening method, before applying the immunological tests (Transia plate SET, Vidas SET2 and CRL

confirmatory detection methods). The relative accuracy (AC), specificity (SP) and sensitivity (SE) were evaluated according to the qualitative part of the EN ISO 16140. Since 2001, our laboratory has been accredited by the COFRAC, the French accreditation body, according to the ISO 17025 Standard for the detection of SEs in milk products.

Extraction of staphylococcal enterotoxins

Briefly, from each sample, 25 g was mixed in 50 ml of distilled water at 38°C ± 2°C, using an Ultra Turrax (IKA, Stanfen, Germany). The slurry was adjusted with HCl 5 mol l⁻¹ (Merck, Darmstadt, Germany) to pH 3.5 ± 0.5 in order to precipitate caseins, then centrifuged at 10 000 g, at 4°C for 15 min. The aqueous supernatant was adjusted to pH 7.3 ± 0.3 with NaOH 5 mol l⁻¹ (Merck) and centrifuged as described above. The supernatant was filtered through glass wool and concentrated by a dialysis membrane MWCO: 6–8000 (Spectrum Laboratories Inc., Rancho Dominguez, CA, USA) against a 30% polyethylene glycol (Merck) solution, overnight at 4°C. The concentrated protein extract was recovered and adjusted to a final weight of 5 g with a phosphate-buffered saline (PBS: NaCl/Na₂HPO₄: 145 mmol l⁻¹/10 mmol l⁻¹, pH 7.3 ± 0.3) solution.

Detection of staphylococcal enterotoxins

Treatment using rabbit IgG

As an additional step before detection to reduce non-specific cross-reaction, some concentrated food extracts were treated with rabbit plasma: 2 µl of IgG purified from rabbits of our laboratory animal house (1 mg ml⁻¹) were added to 1 ml of the concentrated protein extract and incubated at room temperature for 1 h using a rotator.

Vidas SET2

The Vidas SET2 is a rapid and fully automated kit detecting, without differentiation, the SEA to SEE, using a cone coated with antibodies specific for SEA, SEB, SECs, SED and SEE. An immune complex is formed between (i) the coated antibodies, (ii) the toxins in the concentrated extract and (iii) the anti-SE antibodies conjugated with alkaline phosphatase. All reagents are included in the wells of the strip used.

Briefly, 500 µl of the concentrated protein extract or 500 µl of the controls (positive C₁ and negative C₂) are distributed in the strips and incubated in the automate miniVidas. Two fluorescence measures (sample, blank) are performed for each test by the automate. The ratio (relative fluorescence value) between these two measures is interpreted to declare or not a sample as positive.

Table 1 Characteristics of the *Staphylococcus aureus* isolates

Isolates	PCR	SET-RPLA	Vidas SET2		Transia plate SET		CRL confirmatory method	
			-IgG	+IgG	-IgG	+IgG	-IgG	+IgG
125 B	<i>sea, sed, selj</i>	SEA, SED	+	+	+	+	ND	SEA, SED, SEC
255 D	<i>sea, seh</i>	SEA	+	+	+	+	ND	SEA, SEC
256 D	<i>sea, seh</i>	SEA	+	+	+	+	ND	SEA, SEC
257 D	<i>sea, seh</i>	SEA	+	+	+	+	ND	SEA, SEC
293 E	<i>sec</i>	SEC	+	+	+	+	ND	SEC
301 E	<i>sea, sed, selj</i>	SEA, SED	+	+	+	+	ND	SEA, SED
320 E	<i>sea_v*</i>	SEA	+	+	+	+	ND	SEA
334 E	<i>sea, seg, sei</i>	SEA	+	+	+	+	ND	SEA
337 E	<i>sea, seb_v, sed_v, seg, sei, selj†</i>	SEA, SEB, SED	+	+	+	+	ND	SEA, SEB, SED
338 E	<i>sec, seg, sei</i>	SEC	+	+	+	+	ND	SEC
339 E	<i>seb, seg, sei</i>	SEB	+	+	+	+	ND	SEB
349 E	<i>sea, sed, selj</i>	SEA, SED	+	+	+	+	ND	SEA, SED
353 E	<i>sea, sed, selj</i>	SEA, SED	+	+	+	+	ND	SEA, SED
360 F	<i>sea, seh</i>	SEA	+	+	+	+	ND	SEA
361 F	<i>sea, sed, selj</i>	SEA, SED	+	+	+	+	ND	SEA, SED
369 F	<i>sea, sed, selj</i>	SEA, SED	+	+	+	+	ND	SEA, SED
370 F	<i>sea, sed, seg, sei, selj</i>	SEA, SED	+	+	+	+	SEA, SED	SEA
371 F	<i>sea, sed, selj</i>	SEA, SED	+	+	+	+	ND	SEA, SED
372 F	<i>sea</i>	SEA	+	+	+	+	ND	SEA
373 F	<i>seb, seg, sei</i>	SEB	+	+	+	+	ND	SEB
374 F	<i>seb, seg, sei</i>	SEB	+	+	+	+	ND	SEB
377 F	<i>sec</i>	SEC	+	+	+	+	ND	SEC
378 F	<i>sec</i>	SEC	+	+	+	+	ND	SEC
383 F	<i>sec, seg, seh, sei, selu</i>	SEC	+	+	+	+	ND	SEA, SEC
384 F	<i>sea, sed, selj</i>	SEA, SED	+	+	+	+	ND	SEA, SED
387 F	<i>sea, seh</i>	SEA	+	+	+	+	SEA, SEC	SEA
388 F	<i>sea</i>	SEA	+	+	+	+	ND	SEA
395 F	<i>sea</i>	SEA	+	+	+	+	ND	SEA, SEB, SEC
398 F	<i>sea, sed, selj</i>	SEA, SED	+	+	+	+	ND	SEA, SED
399 F	<i>sed, seg, sei, selj</i>	SED	+	+	+	+	ND	SED
402 F	<i>sea</i>	SEA	+	+	+	+	ND	SEA
437 G	<i>sea, seh</i>	SEA	+	+	+	+	ND	SEA, SEC
419 G	<i>seg, sei</i>	-	-	-	-	-	ND	-
424 G	<i>seg, sei</i>	-	-	-	-	-	ND	-
425 G	<i>seg, sei</i>	-	-	-	-	-	ND	-
356 E	<i>seg, sei</i>	-	-	-	-	-	ND	-
422 G	-	-	-	-	-	-	ND	-
393 F	-	-	-	-	-	-	ND	-
124 B	-	-	-	-	+	-	ND	-
324 E	-	-	-	-	+	+	ND	SEB, SEC
325 E	<i>seg, sei</i>	-	+	+	+	+	ND	SEB
363 F	-	-	-	-	+	-	ND	-
381 F	-	-	-	-	+	+	ND	SEA, SEB, SEC
390 F	-	-	-	-	+	+	ND	SEA, SEC
391 F	-	-	-	-	+	-	ND	-
423 G	-	-	-	-	+	-	ND	-

ND, not done.

*. †, Letertre et al. (2003c).

Transia plate staphylococcal enterotoxins

The Transia plate SET kit is a global qualitative ELISA test, which uses a microtitre plate coated with antibodies

specific for SEA, SEB, SECs, SED and SEE. An immune complex is formed between (i) the coated antibodies, (ii) the toxins in the concentrated protein extract and (iii)

Table 2 Characteristics of the milk samples

Matrix	Processing milk	Sample	CPS number (CFU g ⁻¹)	Protein A (ng ml ⁻¹)		Vidas SET2		Transia plate SET		CRL confirmatory method		Interpretation		
				-lgG	+lgG	-lgG	+lgG	-lgG	+lgG	-lgG	+lgG			
Cheese	cow	CC 1	>10 ³			+	+	+	+	(SEA) (SEC)*	ND	PA		
		CC 2	>10 ³			+	+	+	+	(SEA) (SEC)	ND	PA		
		CC 3	>10 ³			+	+	+	+	(SEA) (SEC)	ND	PA		
		CC 4	>10 ³			+	+	+	+	SEA (SEC)	ND	PA		
		CC 5	>10 ³			+	+	+	+	(SEA) (SEC)	ND	PA		
		CC 6	>10 ³			+	+	+	+	(SEA) (SEC)	ND	PA		
		CC 7	>10 ³			+	+	+	+	SEA (SEC)	ND	PA		
		CC 8	>10 ³			+	+	+	+	SED	ND	PA		
		CC 9	>10 ³			+	+	+	+	SED	ND	PA		
		CC 10	>10 ³			+	+	+	+	SED	ND	PA		
		CC 11	5.9 × 10 ⁴			+	+	+	+	(SEA)	ND	PA		
		CC 12†	Not available	36	54	+	+	+	+	SED	SED	PA		
		CC 13†	Not available	47	20	+	+	+	+	SED	SED	PA		
Cheese	goat	CG 1	>10 ³			+	+	+	+	SEC	ND	PA		
Cheese	ewe	CE 1†	>10 ³			+	+	+	+	SEA	ND	PA		
Cheese	Not specified	C 1	>10 ³			+	+	+	+	SEA	ND	PA		
		C 2	>10 ³			+	+	+	+	SEA	ND	PA		
		C 3	>10 ³			+	+	+	+	SEB	ND	PA		
Cake	cow	C 4†	Not available	20	21	+	+	+	+	SEA	ND	PA		
Chocolate milk	cow	C 5†	7.6 × 10 ²	90	244	+	+	+	+	(SEA)	(SEA)	PA		
Cheese	cow	CC 14	>10 ³			-	-	-	-	-	ND	NA		
		CC 15	>10 ³			-	-	-	-	-	ND	NA		
		CC 16	>10 ³			-	-	-	-	-	ND	NA		
		CC 17	>10 ³			-	-	-	-	-	ND	NA		
		CC 18	>10 ³			-	-	-	-	-	ND	NA		
		CC 19	>10 ³			-	-	-	-	-	ND	NA		
		CC 20	>10 ³			-	-	-	-	-	ND	NA		
Cheese	cow	CC 21	3.8 × 10 ⁴			-	-	-	-	-	ND	NA		
		CC 22	7.10 ⁴	0	0	-	-	-	-	-	ND	NA		
		CC 23	3.3 × 10 ⁵	10	18	-	-	-	-	-	ND	NA		
		CC 24	>10 ³	2	15	-	-	-	-	-	ND	NA		
		CC 25	>10 ³	6	14	-	-	-	-	-	ND	NA		
		CC 26	>10 ³	26	18	-	-	-	-	-	ND	NA		
		CC 27	>10 ⁶	14	35	-	-	-	-	-	ND	NA		
		CC 28†	Not available	35	35	-	-	-	-	-	-	NA		
		Cheese	goat	CG 2	>10 ³			-	-	-	-	-	ND	NA
				CG 3	>10 ³			-	-	-	-	-	ND	NA
CG 4	2 × 10 ²					-	-	-	-	-	ND	NA		
CG 5	>10 ³					-	-	-	-	-	ND	NA		
CG 6	>10 ³					-	-	-	-	-	ND	NA		
CG 7	>10 ³					-	-	-	-	-	ND	NA		
CG 8	>10 ³					-	-	-	-	-	ND	NA		
CG 9	>10 ³					-	-	-	-	-	ND	NA		
CG 10	>10 ³					-	-	-	-	-	ND	NA		
CG 11	>10 ³			1	1	-	-	+	-	-	-	NA		
CG 12	>10 ³			24	21	-	-	+	-	-	-	NA		
CG 13	>10 ³			48	42	-	-	+	-	-	-	NA		
CG 14	2.10 ⁴			24	13	-	-	-	-	-	ND	NA		
CG 15	>10 ³			7	14	-	-	-	-	-	ND	NA		
Cheese	ewe			CE 2	>10 ³			-	-	-	-	-	ND	NA
		CE 3	>10 ³			-	-	-	-	-	ND	NA		
		CE 4	>10 ³			-	-	-	-	-	ND	NA		

Table 2 Continued

Matrix	Processing milk	Sample	CPS number (CFU g ⁻¹)	Protein A (ng ml ⁻¹)		Vidas SET2		Transia plate SET		CRL confirmatory method		Interpretation
				-IgG	+IgG	-IgG	+IgG	-IgG	+IgG	-IgG	+IgG	
Cheese	ewe	CE 5	>10 ³			-	-	-	-		ND	NA
Raw milk	goat	MG 1	7.5 × 10 ²			-	-	-	-		ND	NA
Cheese	cow	CC 29	>10 ³	31	24	-	-	+	-	(SEB) (SEC)	SEC	PD‡
		CC 30	>10 ³	27	30	-	-	-	-	(SEB) (SED)	ND	PD‡
Cheese	goat	CG 16	>10 ³	30	30	-	-	+	-	(SEB) SEC	(SEB) (SEC)	PD‡
		CG 17	>10 ³	22	24	-	-	+	-	SEC	SEC	PD‡
Cheese	ewe	CE 6	Not available	82610	79061	-	-	+	-	SEC SED	SEC (SED)	PD‡
		CE 7	>10 ³	21	34	-	-	+	-	(SEC)	ND	PD‡
Cheese	cow	CC 31	>10 ³	22	21	-	-	+	+	-	-	PD
		CC 32†	Not available	39	29	-	-	+	+	-	-	PD

ND, not done; PA, positive agreement; NA, negative agreement; PD, positive deviation of the Transia plate SET.

*Amount of SE lower than limit of quantification.

†Samples suspected and/or involved in SFPO.

‡False positive of the CRL confirmatory method.

the anti-SE antibodies conjugated with peroxidase. All reagents are included in the kit.

Briefly, 100 µl of the concentrated protein extract or 100 µl of the positive and negative controls is distributed in assigned wells and incubated at room temperature for 30 min while shaking (600 rev min⁻¹) in an incubator/shaker (iEMS; Labsystems, Helsinki, Finland). After washing five times with the washing solution of the kit, 100 µl of the conjugate is added into each well and incubated as previously described. After washing, the presence of SEs is revealed by a mixture 1 : 1 of peroxidase substrate (H₂O₂)/chromogen (TMB). Then, the reaction is stopped using a solution of H₂SO₄ 1 mol l⁻¹, and a colorimetric measurement is performed at 450 nm using a spectrophotometer (MRX 3100; Dynex Technology, Dekendorf, Germany).

SET-reverse passive latex agglutination

The SET-RPLA is based on the technique of RPLA. It is a semi-quantitative test that enables to individually detect SEA, SEB, SECs and SED in culture supernatants. Polystyrene latex particles are sensitized with purified antiserum taken from rabbits, immunized individually with purified SEA, SEB, SEC and SED. These latex particles will agglutinate in the presence of the corresponding enterotoxin. A control reagent is provided, which consists of latex particles sensitized with nonimmune rabbit globulins. The test is performed in V-well microtitre plates. Dilutions of the culture filtrate are prepared in five rows of wells, a volume of the appropriate latex suspension is added to each well and the contents mixed. If SEA, SEB, SEC or SED is present, agglutination occurs, which results in the formation of a lattice structure. If SEs are absent or are present at a concentration

below the assay detection level, such lattice structure is not formed and a tight button will be observed on the bottom of the well.

Community Reference Laboratory confirmatory method

Differential detection and characterization of SEs were performed by a quantitative indirect sandwich-type ELISA. For the detection step, specific Mabs (Lapeyre *et al.* 1987) were used as coating antibodies and rabbit polyclonal antibodies as probing antibodies. The presence of SEs is revealed by goat antirabbit immunoglobulins coupled to horseradish peroxidase and determined by a colorimetric measurement. All experiments have been conducted as described by Hennekinne *et al.* (2003), including the following modifications of the initial technique: the microtitre plates (Immulon II; Dynatech, Dekendorf, Germany) were coated with 50 µl of purified Mabs at concentrations of 5, 4, 10 and 2 µg ml⁻¹ for Mabs SEA to SED, respectively, in a PBS solution. A standard curve for each plate was generated by incubating 200 µl of SEA to SED (Toxin Technology, Sarasota, FL, USA) at an increasing final concentration from 0.0625 to 1 ng ml⁻¹ (SEA and SED) and 0.250–4 ng ml⁻¹ (SEB and SEC) in PBS, 0.2% gelatin (Merck), 0.1% Tween (PBS–gelatin–tween).

Quantification of protein A in concentrated protein extracts

The amount of protein A in concentrated extracts was checked using the quantitative test TiterZyme EIA protein A (distributed by Euromedex, Mundolsheim, France) with the following modifications: (i) preparations with a known concentration of protein A were generated using

the same phosphate-buffered solution used to recover SEs, instead of the buffer available in the kit and (ii) the concentrated protein extracts have been submitted, or not, to the rabbit plasma treatment before the quantification step.

Validation procedure

Characterization of the Vidas SET2 detection kit and comparison with the Transia plate SET

Before conducting the validation procedure, the relative limits of detection of the Vidas SET2 and the Transia plate SET detection kits were studied using (i) standard curves (0, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1 and 2 ng ml⁻¹) in PBS for the SE types A, B, C₂, D and E and (ii) internal reference material. This material based on freeze-dried

Table 3 Evaluation of the sensitivity of the Vidas SET2 and the Transia plate SET detection kits

	Standard curves		Internal reference material	
	Transia plate SET (ng ml ⁻¹)	Vidas SET2 (ng ml ⁻¹)	Transia plate SET (ng g ⁻¹)	Vidas SET2 (ng g ⁻¹)
SEA	0.0625	0.0625	0.1	0.1
SEB	0.125	0.0625	0.25	0.5
SEC ₂	0.25	0.5	>0.5	>0.5
SED	0.0625	0.0625	>0.25	>0.25
SEE	0.5	0.5	0.1	0.25

Table 4 Evaluation of the specificity of the Vidas SET2 and the Transia plate SET detection kits

	Transia plate SET OD at 450 nm*	Interpretation	Vidas SET2 RFV (TV)†	Interpretation
Blank goat cheese 1	0.253	-	18 (0)	-
Blank goat cheese 2	0.258	-	19 (0)	-
Blank goat cheese 3	0.245	-	19 (0)	-
Blank goat cheese 4	0.458	+	18 (0)	-
Blank goat cheese 5	0.36	+	16 (0)	-
Blank goat cheese 6	0.374	+	14 (0)	-
Goat cheese 1‡	1.607	+	5000 (1.26)	+
Goat cheese 2‡	1.623	+	5133 (1.30)	+
Goat cheese 3‡	1.468	+	4514 (1.14)	+
Goat cheese 4‡	0.75	+	1167 (0.29)	+
Goat cheese 5‡	0.89	+	1250 (0.31)	+
Goat cheese 6‡	0.67	+	1042 (0.26)	+
Blank cow cheese 1	0.444	+	49 (0.01)	-
Blank cow cheese 2	0.391	+	37 (0)	-
Blank cow cheese 3	0.447	+	54 (0.01)	-
Blank cow cheese 4	0.423	+	45 (0.01)	-
Blank cow cheese 5	0.42	+	38 (0)	-
Blank cow cheese 6	0.425	+	43 (0.01)	-

*Cut-off value of the Transia plate SET = 0.345 OD.

†Cut-off value of the Vidas SET2 = 0.13.

‡0.1 ng SEA g⁻¹.

cheese, spiked or not, has been previously developed by our laboratory for proficiency trials to the Community laboratory network (Hennekinne *et al.* 2003) (Table 3).

Additional experiments have been conducted to evaluate the specificity of both Transia plate SET and Vidas SET2 detection kits on 18 cheeses made from cow's and goat's milk (Table 4).

Calculation of performance parameters

In this study, the Transia plate SET detection kit has been used as the reference method and the Vidas SET2 has been considered as the alternative method. To calculate the statistical parameters, such as AC, SP and SE, two cases have been considered according to the analytical protocols including or not the rabbit IgG treatment.

The characterization of the Vidas SET2 kit in comparison to the Transia plate SET detection kit was expressed in terms of AC (degree of correspondence between the response obtained by the reference method and the response obtained by the alternative method on identical samples), SE (ability of the alternative method to detect the analyte when it is detected by the reference method) and SP (ability of the alternative method to not detect the analyte when it is not detected by the reference method), according to the calculations described in the EN ISO 16140 Standard (Table 5).

The confidence intervals associated with these parameters were also calculated, according to Annex E of the EN ISO 16140 Standard.

Table 5 General terms and calculations according to the EN ISO 16140 Standard

	Reference method positive	Reference method negative
Alternative method positive	Positive agreement (PA)	Positive deviation (PD)
Alternative method negative	Negative deviation (ND)	Negative agreement (NA)
Relative accuracy (AC)	$AC = (PA + NA)/N^*$	
Relative specificity (SP)	$SP = (NA/N_{-}\dagger)$	
Relative sensitivity (SE)	$SE = (PA/N_{+}\ddagger)$	

*N, total number of samples (NA + PA + PD + ND).

†N₋, number of negative samples according to the reference method (NA + PD).

‡N₊, number of positive samples according to the reference method (PA + ND).

Results

Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates

Staphylococcus aureus isolates were characterized by PCR typing of the *se* genes and by enterotoxin determination as shown in Table 1.

The concordance between PCR and the immunological tests was calculated for SEA to SED. The percentage of concordance with PCR was 100% for SET-RPLA, 97.8% for Vidas SET2, 91.3% for Transia plate SET and 76.1% for CRL confirmatory method.

PCR, SET-RPLA and Vidas SET2 were in total agreement except for the isolate 325 E that was tested positive by Vidas SET2 and negative according to PCR and SET-RPLA.

Without employing the rabbit IgG treatment, the Transia plate SET displayed false-positive results in 17.4% of the tested isolates. When the rabbit IgG treatment was applied, this rate clearly decreased to 8.7%, but the Transia plate SET still indicated the presence of SEs in supernatants for four isolates (324 E, 325 E, 381 F, 390 F) without the presence of any gene encoding these toxins according to PCR.

The same trend was observed for the CRL confirmatory method, which gave a false-positive result for 12 isolates, including for the same four strains than for Transia plate SET. In this study, the CRL confirmatory method detected extra enterotoxins such as SEC in association with SEB and, to a lesser extent SEA, which may be related to cross-reaction of the employed antibodies.

Detection of staphylococcal enterotoxins in foods

The results are presented in Table 2. The treatment with rabbit plasma did not induce (i) any positive deviation among the negative agreements and (ii) any negative deviation among the positive agreements, whatever the method used. Among the ten conflicting results (positive according to Transia plate SET and negative according to Vidas SET2), when applying the rabbit IgG treatment, eight of ten positive results, when analysing samples with Transia kit, became negative as found by the other methods. Thus, the rabbit plasma treatment reduced the false-positive rate of the Transia plate SET method from 42% to 8%. Finally, considering the data obtained with the rabbit plasma treatment, 20 samples were clearly tested positive and 34 negative, whatever the method used.

Among the 62 tested samples, seven were suspected or involved in SFPO. The presence of SEs was detected in five of them, whatever the detection method used (Table 2). For one sample, no SE was detected by Transia plate SET, Vidas SET2 or CRL confirmatory method. For the last sample suspected in SFPO, enterotoxins were detected only with the Transia plate SET and could not be confirmed by the other methods.

Protein A content of concentrated extracts

To investigate whether the false positive obtained with Transia plate SET observed with certain samples could be explained by the presence of protein A, 24 samples including the ones having led to conflicting results were tested. The data shown in Table 2 highlight a high content of protein A in only one sample, with 79 061–82 610 ng ml⁻¹ of protein A. The other samples usually contained between 20 and 40 ng ml⁻¹ of protein A.

Validation procedure

Characterization of the Vidas SET2 detection kit and comparison with the Transia plate SET

Results of the evaluation study are shown on Table 3 (SE) and Table 4 (SP).

SE studies performed using standard curves highlighted that the relative limits of detection for SEA, SED and SEE were equivalent, whatever the detection method used. Regarding SEB, the Vidas SET2 was found to be able to detect lower amounts than the Transia plate SET2. On the contrary, the Transia plate SET was found to be able to detect lower amounts of SEC₂ than those detected by the Vidas SET2 detection kit.

When considering the results obtained after spiking of blank internal reference material, similar results in terms

Table 6 Comparison of the results using Vidas SET2 and Transia plate without IgG treatment

	Transia plate SET positive	Transia plate SET negative
Vidas SET2 positive	20	0
Vidas SET2 negative	10	32

Table 7 Comparison of the results using Vidas SET2 and Transia plate with IgG treatment

	Transia plate SET positive	Transia plate SET negative
Vidas SET2 positive	20	0
Vidas SET2 negative	2	40

of SE were obtained by Transia plate SET and Vidas SET2 for SEA, SEC₂ and SED.

Results obtained during the few but sufficient experiments conducted to evaluate the specificity of the Vidas SET2 highlighted that this detection step did not give false-positive results (Table 4).

Calculation of relative accuracy, specificity and sensitivity

Tables 6 and 7 present the numbers of positive and negative agreements, positive and negative deviations used to calculate statistical parameters.

The comparison of the SE detection using Transia plate SET and the Vidas SET2 without IgG treatment for 62 samples of milk and milk-based products (Table 6) gave AC, SE and SP values of 84 ± 9 ; 67 ± 17 and 100%, respectively. As these two methods are both qualitative, a Mc Nemar chi-square test was conducted to assess the statistical difference between the two methods, as described in the appendix F of the EN ISO 16140 Standard. This statistical analysis showed that both methods can be considered as different at $\alpha < 0.05$.

The same approach with IgG treatment (Table 7) led to values for AC, SE and SP equal to 97–3%; 91–11% and 100%, respectively. As the number of conflicting results was lower than six, as described in the EN ISO 16140 Standard, no statistical analysis could be conducted to conclude on the statistical difference between the two methods. Finally, when using IgG treatment, both methods can be considered as equivalent to detect SEs in naturally contaminated milk products.

Discussion

Milk products, as well as other foods with a high protein content, are good substrates for the growth of *Staph. aureus* and the production of SEs. Therefore, such products

can be involved in food-borne diseases because of the occurrence of CPS in raw milk and/or a cross-contamination during the process. An overview of outbreak reports from 15 European countries indicated that milk and dairy products were involved in 1–9% (mean 4.8%) of all the incriminated foods in staphylococcal outbreaks (De Buyser *et al.* 2001; Anon 2003a). Thus, to assess food safety for consumers, there is a crucial need for a specific and sensitive method to detect low amounts (lower than 0.1 ng g^{-1}) of SEs in dairy products.

Importance of characterizing *Staphylococcus aureus* isolates

In order to validate a method dedicated for official controls, it is necessary to characterize it by an intralaboratory study before testing its practicability, transferability and precision through an interlaboratory study. Prior to conduction of the comparative study of the alternative method *vs* the reference one on food samples, the performances of both methods were checked on characterized *Staph. aureus* isolates.

As reported in various studies (Klotz *et al.* 2003; Leterre *et al.* 2003c; Loncarevic *et al.* 2005) for all the isolates where the production of SEs from A to D was assessed by SET-RPLA, the presence of *se* genes was confirmed by PCR. Thus, the SET-RPLA can be considered as a suitable tool to characterize isolates harbouring classical *se* genes. Some discrepant results were obtained using ELFA- or ELISA-based methods like the considered kits (Transia plate SET, Vidas SET2 and CRL confirmatory method). Western blots were performed on the isolate supernatants showing conflicted results but were not usable because of heavy cross-reactions (data not shown). For isolates where SEA, SEB and/or SEC were detected by the CRL confirmatory method when no corresponding *se* gene was found by PCR, DNA-DNA hybridizations highlighted a lack of SP of some of the antibodies used for the CRL confirmatory method (data not shown). Besides, the results obtained with the isolate 325 E harbouring *seg* and *sei* genes would indicate (i) that antibodies from Transia plate SET, Vidas SET2 and CRL confirmatory methods could cross-react with SEG whose sequence is more or less homologous to SEB or (ii) that a variant *se* gene from *sea* to *see* could not be recognized by the primers used.

Impact of protein A and the impact of rabbit serum

Immunological detection of SEs has several drawbacks. Nonspecific reactions with some of the commercially available kits were previously reported with various food types or with foods contaminated by other micro-organisms than *Staphylococcus* spp. (Park *et al.* 1992; Wu *et al.* 1992). Moreover it is well known that proteins such as

protein A (Notermans *et al.* 1982; Martin and Beelman 1996) can bind the Fc fragment (and to a lesser extent, Fab fragments) of IgG of several animal species such as mouse or rabbit, but not rat or goat. Unfortunately, most of the ELISA-based detection kits were built using mouse Mabs as coating ones and rabbit polyclonal antibodies as probing ones. Protein A is produced by most of the strains of *Staph. aureus*. The EC Council Directive 92/46 (Anon 1992) enforced to test SEs in milk products placed on the market during their shelf life when CPS counts exceed 10^3 or 10^4 CFU g^{-1} for cheeses made from thermized or raw milk, respectively. Currently, the new regulation (Anon 2005) requires to enumerate CPS in milk products during the manufacturing process when the number of staphylococci is expected to be the highest. If the CPS counts are higher than 10^5 CFU g^{-1} , the detection of SEs must be performed. Considering these CPS levels, we decided to check the protein A content of concentrated protein extracts in order to investigate a possible correlation between CPS counts, protein A contents and positive deviations.

All the results, except one, did not show an obvious correlation between the CPS number and the concentration of protein A in the concentrated protein extracts. In addition, in a few cases, the treatment with rabbit IgG of the concentrated protein extracts increased the amount of protein A detected. These data are in accordance with those obtained after a rabbit IgG treatment, which can increase the background level of ELISA tests (Lapeyre *et al.* 1996).

However, this study showed that a treatment using IgG can significantly decrease the rates of false positives observed with the Transia plate SET kit. The binding of rabbit IgG to protein A almost completely eliminated false-positive results (from 42% to 8%) and permitted the detection of SEs in immunoassays where protein A is present.

Other interferences can be attributed to endogenous enzymes such as alkaline phosphatase or lactoperoxidase obtained from raw milk. The alkaline phosphatase is usually present in cheeses made from raw milk. A heat-treatment at 80°C during 2 min can be performed to destroy it. As this heat-treatment can lead to a loss of serological activity of the enterotoxins present in the concentrated extract, it is not performed before the detection step because of a possible false-negative result. The lactoperoxidase is resistant to pH 3 and its high molecular weight could explain the fact that it is not destroyed or inactivated during the extraction step.

Comparison of Vidas SET2 and Transia plate SET

In recent studies, Vernozy-Rozand *et al.* (2004) and Bennett (2005) compared different immunological-based

methodologies for the detection of SEs in foods. Vernozy-Rozand *et al.* (2004) compared three immunological methods by estimating their SP and SE in various food samples spiked with SEs, where Bennett (2005) tested detection methods on naturally contaminated products and showed the high efficiency of the Vidas SET2 for the detection of SEs in canned mushrooms among three ELISA-based methods. Although Vernozy-Rozand *et al.* used a different protein precipitation step (use of trichloroacetic acid) when compared with ours, we found similar results in terms of sensitivity (Table 3). Our study showed that Transia plate SET and Vidas SET2 had similar limits of detection after an extraction step using dialysis concentration. Table 4 showed that the Vidas SET2 kit was more efficient than the Transia plate SET.

In the European screening method using Transia plate SET, global content of SEA to SEE are detected by a three-step sandwich qualitative ELISA. Indeed, because of the type of antibodies used in the Transia plate SET kit (mouse monoclonal and rabbit polyclonal antibodies), the observed interferences may be related to the capability of the protein A to cross-react with the Fc fragment of immunoglobulins coming from these two species. On the contrary, the Vidas SET2 is based on the ELFA principle. In the innovative Vidas SET2 test, complementary monoclonal and polyclonal antibodies raised from rat or goat and directed against SEA, SEB, SECs, SED and SEE are used for the capture and detection process. In addition, a specific treatment was applied to remove the sticky Fc fragment of the antibody-enzyme conjugate in order to avoid interferences. In such a condition, no interference because of the protein A can be pointed out with the antibodies of this detection kit.

If a rabbit IgG treatment is used before Transia plate SET, both methods, Transia plate SET and Vidas SET2, can be considered as similar in terms of AC, SE and SP and can be considered as suitable to screen SEs in milk products. Some discrepant results were obtained using the CRL confirmatory method when compared with Vidas SET2 and Transia plate SET. In six samples, results were found to be positive according to the CRL confirmatory method and negative according to Transia plate SET and Vidas SET2, especially for the toxin SEC. This fact can be due to (i) the differences between the limits of detection of the three tests performed. The limits of detection of the Transia plate SET and Vidas SET2 were found to be higher than 0.5 ng g^{-1} for SEC, where the limit of detection of the CRL confirmatory method for this toxin type is lower than 0.1 ng g^{-1} or (ii) the lack of SP of the anti-SEC antibodies used in this test as previously hypothesized.

Of the seven samples suspected or involved in staphylococcal food poisonings, SEs were detected in five of

them (CE 1, CC 12, CC 13, C 4 and C 5), whatever the detection method used. For the two others (CC 32 and CC 28), toxins were not detected by Vidas SET2 and CRL confirmatory method probably because of heterogeneity of the matrix contamination, the initial amount of the toxin, the type of toxin and/or the long-time storage of these samples.

A particular difficulty in such a study was to obtain enough naturally contaminated samples to compare qualitative methods according to the protocol of the EN ISO 16 140 Standard.

The results of this study showed that both Transia plate SET using a prerabbit treatment and Vidas SET2 without treatment can be used to assess the food safety of milk products according to the EU Regulation.

Moreover, the Vidas SET2 detection kit was also validated by AOAC as a performance-tested method 'http://www.aoac.org/testkits/070404Certificate.pdf' (AOAC 2004).

Considering the results obtained in this study, the Vidas SET2 proved to be rapid, sensitive and specific enough to detect SEs in milk products. An interlaboratory study is now in progress to fully validate the Vidas SET2 before proposing it at the European level as one method to screen SEs contents in milk products.

Acknowledgements

The authors thank bioMérieux for kindly providing the miniVidas system and part of the reagents used in this study.

References

- Anon (1992) Council Directive 92/46/EEC of 16 June 1992 laying down the health rules for the production and placing on the market of raw milk, heat-treated milk and milk-based products. *Official Journal* **L268**, 01–31.
- Anon (2003a) DG – SANCO: *Staphylococcal enterotoxins in milk products especially cheeses*. 26–27 March 2003. http://www.europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scv/out61_en.pdf.
- Anon (2003b) *EN ISO 16 140. Food Microbiology, Validation of Alternative Methods*. Geneva: International Standardization Organisation.
- Anon (2005) Commission regulation (EC) no. 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. *Official Journal, L* **338**, 1–26.
- AOAC (2004) *Certificate of performance tested status*. 6 October 2004. <http://www.aoac.org/testkits/070404Certificate.pdf> Certificate number 070404.
- Asao, T., Kumeda, Y., Kawai, T., Shibata, T., Oda, H., Haruki, K., Nakazawa, H. and Kozaki, S. (2003) An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. *Epidemiol Infect* **130**, 33–40.
- Balaban, N. and Rasooly, A. (2000) Review – staphylococcal enterotoxins. *Int J Food Microbiol* **61**, 1–10.
- Bennett, R.W. (2005) Staphylococcal enterotoxin and its rapid identification in foods by enzyme-linked immunosorbent assay-based methodology. *J Food Prot* **68**, 1264–1270.
- Bergdoll, M.S. (1970) Enterotoxins. In *Microbial Toxins*, vol. 3. ed. Montie, T.C., Kadis, S. & Ajl, S.J. pp. 265–326. New York, NY: Academic Press.
- De Buysier, M.L., Dufour, B., Maire, M. and Lafarge, V. (2001) Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries. *Int J Food Microbiol* **67**, 1–17.
- Hawryluk, T. and Hirshfield, I. (2002) A super antigen bioassay to detect staphylococcal enterotoxin A. *J Food Prot* **65**, 1183–1187.
- Hennekinne, J.A., Gohier, M., Maire, T., Lapeyre, C., Lombard, B. and Dragacci, S. (2003) First proficiency testing to evaluate the ability of National Reference Laboratories of the European Union to detect staphylococcal enterotoxins in milk products. *J AOAC Int* **86**, 332–339.
- Ikeda, T., Tamate, N., Yamaguchi, K. and Makino, S. (2005) Mass outbreak of food poisoning disease caused by small amounts of staphylococcal enterotoxins A and H. *Appl Environ Microbiol* **71**, 2793–2795.
- Jablonski, L.M. and Bohach, G. (1997) *Staphylococcus aureus*. In *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers* ed. Doyle, M.P., Beuchat, L.R. and Montville, T.J. pp. 353–357. Washington DC: American Society of Microbiology Press.
- Jarraud, S., Peyrat, M.A., Lim, A., Tristan, A., Bes, M., Mougel, C., Etienne, J., Vandenesch, F. *et al.* (2001) egc, a highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*. *J Immunol* **166**, 669–677; erratum 4260.
- Jorgensen, H.J., Mathisen, T., Lovseth, A., Omoe, K., Qvale, K.S. and Loncarevic, S. (2005) An outbreak of staphylococcal food poisoning caused by enterotoxin H in mashed potato made with raw milk. *FEMS Microbiol Lett* **252**, 267–272.
- Katsuda, K., Hata, E., Kobayashi, H., Kohmoto, M., Kawashima, K., Tsunemitsu, H. and Eguchi, M. (2005) Molecular typing of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitic milk on the basis of toxin genes and coagulase gene polymorphisms. *Vet Microbiol* **105**, 301–304.
- Klotz, M., Opper, S., Heeg, K. and Zimmermann, S. (2003) Detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxins A to D by real-time fluorescence PCR assay. *J Clin Microbiol* **41**, 4683–4687.
- Lapeyre, C., Kaveri, S.V., Janin, F. and Strosberg, A.D. (1987) Production and characterization of monoclonal antibodies to staphylococcal enterotoxins: use in immunodetection and immunopurification. *Mol Immunol* **24**, 1243–1254.

- Lapeyre, C., Janin, F. and Kaveri, S.V. (1988) Indirect double sandwich ELISA using monoclonal antibodies for detection of staphylococcal enterotoxins A, B, C1 and D in food samples. *Food Microbiol* **5**, 25–31.
- Lapeyre, C., de Solan, M.N. and Drouet, X. (1996) Immunoenzymatic detection of staphylococcal enterotoxins: international interlaboratory study. *J. AOAC Int* **79**, 1095–1101.
- Letertre, C., Perelle, S., Dilasser, F. and Fach, P. (2003a) Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by the *egc* cluster of *Staphylococcus aureus*. *J Appl Microbiol* **95**, 38–43.
- Letertre, C., Perelle, S., Dilasser, F. and Fach, P. (2003b) Detection and genotyping by real-time PCR of the staphylococcal enterotoxin genes *sea* to *sej*. *Mol Cell Probes* **17**, 139–147.
- Letertre, C., Perelle, S., Dilasser, F. and Fach, P. (2003c) A strategy based on 5' nuclease multiplex PCR to detect enterotoxin genes *sea* to *sej* of *Staphylococcus aureus*. *Mol Cell Probes* **17**, 227–235.
- Loncarevic, S., Jorgensen, H.J., Lovseth, A., Mathisen, T. and Rorvik, L.M. (2005) Diversity of *Staphylococcus aureus* enterotoxin types within single samples of raw milk and raw milk products. *J Appl Microbiol* **98**, 344–350.
- Mac Lauchlin, J., Narayanan, G.L., Mithani, V. and O'Neill, G. (2000) The detection of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin genes in *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. *J Food Prot* **63**, 479–488.
- Macaluso, L., Lapeyre, C. and Dragacci, S. (1998) Determination of influence factors during sample preparation for staphylococcal enterotoxin detection in dairy products. *Analisis* **26**, 300–304.
- Martin, S.T. and Beelman, R.B. (1996) Growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* in fresh packaged mushrooms (*Agaricus bisporus*). *J Food Prot* **59**, 819–826.
- Normanno, G., Firinu, A., Virgilio, S., Mula, G., Dambrosio, A., Poggiu, A., Decastelli, L., Mioni, R. *et al.* (2005) Coagulase-positive staphylococci and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy. *Int J Food Microbiol* **98**, 73–79.
- Notermans, S., Timmermans, P. and Nagel, J. (1982) Interaction of staphylococcal protein A in enzyme-linked immunosorbent assays for detecting staphylococcal antigens. *J Immunol Methods* **55**, 35–41.
- Omoe, K., Ishikawa, M., Shimoda, Y., Hu, D.L., Ueda, S. and Shinagawa, K. (2002) Detection of *seg*, *seh*, and *sei* genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of the enterotoxin productivities of *S. aureus* isolates harboring *seg*, *seh*, or *sei* genes. *J Clin Microbiol* **40**, 857–862.
- Omoe, K., Hu, D.L., Takahashi-Omoe, H., Nakane, A. and Shinagawa, K. (2003) Identification and characterization of a new staphylococcal enterotoxin-related putative toxin encoded by two kinds of plasmids. *Infect Immun* **71**, 6088–6094.
- Omoe, K., Imanishi, K., Hu, D.L., Kato, H., Fugane, Y., Abe, Y., Hamaoka, S., Watanabe, Y. *et al.* (2005) Characterization of novel staphylococcal enterotoxin-like toxin type P. *Infect Immun* **73**, 5540–5546.
- Orwin, P.M., Leung, D.Y.M., Donahue, H.L., Novick, R.P. and Schlievert, P.M. (2001) Biochemical and biological properties of staphylococcal enterotoxin K. *Infect Immun* **69**, 360–366.
- Orwin, P.M., Leung, D.Y.M., Tripp, T.J., Bohach, G.A., Earhart, C.A., Ohlendorf, D.H. and Schlievert, P.M. (2002) Characterization of a novel staphylococcal enterotoxin-like superantigen, a member of the group V subfamily of pyrogenic toxins. *Biochemistry* **41**, 14033–14040.
- Park, C.E., Akhtar, M. and Rayman, M.K. (1992) Nonspecific reactions of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay kit (TECRA) for detection of staphylococcal enterotoxins in foods. *Appl Environ Microbiol* **58**, 2509–2512.
- Rosec, J.P. and Gigaud, O. (2002) Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France. *Int J Food Microbiol* **77**, 61–70.
- Surgalla, M., Bergdoll, M.S. and Dack, G.M. (1953) Some observations on the assay of staphylococcal enterotoxin by the monkey feeding test. *J Lab Clin Med* **41**, 782–788.
- Vernozy-Rozand, C., Mazuy-Cruchaudet, C., Bavai, C. and Richard, Y. (2004) Comparison of three immunological methods for detecting staphylococcal enterotoxins from food. *Lett Appl Microbiol* **39**, 490–494.
- Wu, Z.L., Zhang, Z.C., Li, C.W., Li, S.S., Xi, Z.Y., Zhou, Y.N. and Yin, C.R. (1992) Study of the non specific reaction problems in the procedure using TECRA kit for detection of staphylococcal enterotoxins. *J Assoc Rapid Method Automation Microbiol* **4**, 105–109.
- Zschock, M., Risse, K. and Sommerhauser, J. (2004) Occurrence and clonal relatedness of *sec/tst*-gene positive *Staphylococcus aureus* isolates of quartermilk samples of cows suffering from mastitis. *Lett Appl Microbiol* **38**, 493–498.

6. Hennekinne J-A., Ostyn A., Guillier F., Gohier M., Messio S., Dragacci S., Krys S, Lombard B. (2007) Interlaboratory validation of the Vidas SET2 detection kit for an use in official controls of staphylococcal enterotoxins detection in milk products especially low-fat cheeses. *Int J. AOAC*, 90, 3, 756-764.

Interlaboratory Validation of the Vidas SET2 Kit for Detection of Staphylococcal Enterotoxins in Milk Products

JACQUES-ANTOINE HENNEKINNE, ANNICK OSTYN, FLORENCE GUILLIER, MARTINE GOHIER, SABINE MESSIO, SYLVIANE DRAGACCI, SOPHIE KRYS, and BERTRAND LOMBARD

French Agency for Food Safety, Laboratory for Study and Research on Quality of Food and on Food Processes (AFSSA-LERQAP), Toxins, Organic Pollutants, and Pesticides Unit, National and Community Reference Laboratory for Coagulase-Positive Staphylococci, Including *Staphylococcus aureus* and Their Toxins, 23 Ave du Général De Gaulle, 94706 Maisons-Alfort Cedex, France

Collaborators: P. Alves; M.C. Bauer; C. Blanco-Vidal; C. Desfargues; K. De Reu; K. Eckner; C. Economides; A.M. Ferrini; N. Gaillard; P. Genot; S. Gornard; L. Guiliani; J. Hummerjohann; P. In't Velt; W. Jacobs-Reistma; J. Ladstatter; G. Montourcy; C. Pires-Gomes; J.L. Pittet; J. Rola; E. Rubert; Z. Srete-Lancz

An earlier intralaboratory validation study based on the EN ISO 16140 Standard conducted by the Community Reference Laboratory for coagulase-positive staphylococci including *Staphylococcus aureus* showed that, after an extraction step using dialysis concentration, the Vidas SET2 detection kit could be used to screen staphylococcal enterotoxins in milk and milk products. In order to fully validate Vidas SET2, an interlaboratory study was organized. Six freeze-dried samples and 3 ready-to-use concentrated extracts were analyzed by 21 laboratories according to the method, including a detection with Vidas SET2. Results did not show false-positive or -negative results. Accordance and concordance parameters were equal to 100%, corresponding to a concordance odds ratio of 1. This interlaboratory study confirmed the satisfactory outcome of the preliminary tests and of the intralaboratory study performed previously. The Vidas SET2 detection kit can be used as a method for the detection of staphylococcal enterotoxins in milk and milk products as well as the Transia Plate SET detection kit in the European screening method for official control purposes, after an extraction step followed by dialysis concentration.

Milk products are good substrates for the growth of *Staphylococcus aureus* and the production of staphylococcal enterotoxins (SE). Therefore, such products can be involved in foodborne diseases due to the occurrence of enterotoxigenic coagulase-positive staphylococci

in raw milk and/or to cross-contamination during processing (1). In order to avoid staphylococcal food poisoning outbreaks and to harmonize, at European level, food controls performed on milk products by food operators, criteria on staphylococci and on SE have been introduced in the new Regulation of the European Commission (EC) on microbiological criteria No. 2073/2005 (2), to be enforced by all European Union Members States since January 1, 2006. This regulation requires the SE detection in raw or thermized milk cheeses when in a 3-class sampling plan, the value M of the number of coagulase-positive staphylococci exceeds 10^5 colony-forming units (CFU)/g or mL at the time during the manufacturing process when the number of staphylococci is expected to be the highest.

The Laboratory for Study and Research on Quality of Food and on Food Processes of the French Agency for Food Safety (AFSSA LERQAP) has been recently designated as Community Reference Laboratory (CRL) for coagulase-positive staphylococci including *S. aureus*, and their toxins (3). Previously, from 1992 to the end of 2005, the CRL for milk and milk products in the frame of Directive 92/46 on the hygiene of the milk chain (4) had conducted an intralaboratory study (5) that proved the capability of the Vidas SET2 (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France), a qualitative global enzyme-linked fluorescent assay (ELFA)-based principle detection kit, to detect SEs in milk products.

The aim of the present paper was to fully validate the Vidas SET2 kit for detection of SEs by performing an interlaboratory trial in order to propose it as an alternative to the detection method using the Transia Plate SET kit (Raisio Diagnostics, formerly Diffchamb, Lyon, France).

METHOD

Organization of the Interlaboratory Validation Study

The interlaboratory study for validation of the Vidas SET2 detection kit was performed according to the protocol of the EN ISO 16140 Standard (6) with the 2 following

modifications: (1) only the Vidas SET2 detection method was used instead of a comparison with the Transia Plate SET detection kit (considered in this case as the reference method), because the same limit of detection (LOD) between Transia plate SET and Vidas SET2 detection kits was previously proved (5), and (2) 4 replicates instead of the 10 required were sent to each participant to decrease their workload, because the method tested (extraction and detection) is particularly heavy to perform.

The sample material used for this study was a 2-level (low and high) spiked and unspiked freeze-dried low fat cheese (Tomme de Savoie, 25% fat) as previously used (7). Homogeneity and stability tests were performed before dispatching the samples to the participants. Six samples of freeze-dried cheese corresponding to blind duplicates for each batch (blank "no toxin," low and high levels) and 3 ready-to-use concentrated protein extracts corresponding to one per batch were sent to each participant. The parcels containing the samples and the documents (a material receipt form, instructions such as storage conditions, a rehydration procedure, the method to be applied, a report sheet to be completed) were sent by express delivery.

For freeze-dried samples, laboratories had to rehydrate them, perform an extraction step using dialysis concentration, and perform a detection step using the Vidas SET2 detection kit. The ready-to-use concentrated protein extracts did not require the extraction step. All samples were to be analyzed in duplicate. Laboratories performed the analysis at week 19, 20, or 21. Participants' results were then compiled and analyzed by the CRL using the accordance and concordance parameters (8) for such qualitative data.

List of Participants

In response to a circular letter addressed to the European National Reference Laboratories (EU-NRL) and to the French network of district veterinary laboratories, 21 laboratories agreed to take part on a voluntary basis in this interlaboratory trial. Participants included 13 EU-NRLs, 7 French district veterinary laboratories, and the kit's manufacturer. All of these laboratories were experienced in the extraction step using dialysis concentration and routinely used the Vidas SET2 detection kit. The codification used for this trial was only known by the CRL, the French Ministry of Agriculture, and the EC General Directorate Health and Consumer Protection.

Preparation of Spiked and Blank Batches of Cheese

In a preliminary study on the feasibility of reference materials for SEs in a cheese matrix performed in 2001, the homogeneity and the stability of these materials were studied (7). As the results obtained were satisfactory, the same spiking protocol was used in this interlaboratory trial. Three levels were prepared: a blank batch of noncontaminated cheese and 2 batches of contaminated cheese containing low (about 0.1 ng/g) and high (about 0.25 ng/g) levels of SEA (Toxin Technology, Sarasota, FL). This toxin type was selected due to its high occurrence (75%) in staphylococcal

foodborne outbreaks (9). The purity of the SEA batch was checked with a size-exclusion chromatography coupled with a sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS PAGE). A low contamination with SE type SED was determined by the CRL confirmatory method (10, 11). The ratio between SEA and SED concentrations was estimated to be equal to 1586, which meant that this low SED amount could not be detected by the detection kits (Transia Plate SET and Vidas SET2) due to their LOD of 0.25 ng SED/g for both kits (5). The freeze-drying was performed after spiking at Institut National Agronomique de Paris-Grignon (INA-PG; Centre de Biotechnologies Agro-Industrielles, Thiverval-Grignon, France) using a freeze-dryer SMH 90 (Usifroid, Maurepas, France).

To obtain a sufficient quantity of powder for each batch, one freeze-drying cycle per batch was necessary to process 6 kg cheese. The freeze-dried powder was vacuum-packed and stored at -18°C . The freeze-dried powder was homogenized and dispatched into bottles (12.5 ± 0.1 g powder/bottle, corresponding to 25 g cheese after rehydration). The vials were randomly numbered and stored at ambient temperature until dispatch.

Preparation of the Ready-to-Use Concentrated Protein Extracts

These samples were prepared in order to assess the capacity of detection of the Vidas SET2 kit. Seven freeze-dried samples at each level were submitted to the extraction step using dialysis concentration in order to obtain 4 samples of 1.2 mL ready-to-use concentrated protein extracts. Among these 4 samples, 3 were sent to participants and one was analyzed by our laboratory to check its SE content using the Vidas SET2 detection kit.

Extraction and Detection of Staphylococcal Enterotoxins

The extraction step was performed according to Hennekinne et al. (7). Treatment using rabbit immunoglobulin G (IgG) and detection methods using Transia Plate SET, Vidas SET2 kits, and CRL confirmatory method were performed as described below.

Treatment Using Rabbit IgG

As an additional step before detection to reduce nonspecific cross-reaction, concentrated food extracts were treated with rabbit plasma: 100 μL decomplexed rabbit IgG (Raisio Diagnostics) was added to 900 μL concentrated protein extract and incubated at room temperature for 1 h using a rotator.

Transia Plate Staphylococcal Enterotoxins

The Transia Plate SET kit is a global qualitative enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) test which uses a microtiter plate coated with antibodies specific for SEA, SEB, SECs, SED, and SEE. An immune complex is formed between the coated antibodies, the toxins in the

concentrated protein extract, and the anti-SE antibodies conjugated with peroxidase. All reagents are included in the kit.

Briefly, 100 μ L of the rabbit-IgG treated protein extract or 100 μ L of the positive and negative controls was distributed in assigned wells and incubated at room temperature for 30 min while shaking (600 rpm) in an incubator/shaker (iEMS, Labsystems, Helsinki, Finland). After washing 5 times with the washing solution of the kit, 100 μ L of the conjugate was added into each well and incubated as previously described. After washing, the presence of SEs was revealed by a mixture 1:1 of peroxidase substrate (H_2O_2)/chromogen (tetramethylbenzidine; TMB). Then the reaction was stopped by using a solution of 1 M H_2SO_4 , and a colorimetric measurement was performed at 450 nm using a spectrophotometer (MRX 3100, Dynex Technology, Berlin, Germany).

Vidas SET2

The Vidas SET2 is a rapid and fully automated kit detecting without differentiation the SE types A to E, using a cone coated with antibodies specific for SEA, SEB, SECs, SED, and SEE. An immune complex is formed between the coated antibodies, the toxins in the concentrated extract, and the anti-SE antibodies conjugated with alkaline phosphatase. All reagents are included in the wells of the strip used. Briefly, 500 μ L concentrated protein extract or 500 μ L of the controls (positive C1 and negative C2) were distributed in the strips and incubated in the automated miniVidas. Two fluorescence measures (sample, blank) were performed for each test by the automate. The ratio (relative fluorescence value; RFV) between these 2 measures was interpreted to declare a sample as positive or not. According to the manufacturer's instructions, a result was considered as positive when the test value (TV) obtained was ≥ 0.13 .

CRL Confirmatory Method

Differential detection and characterization of SEs were performed by a quantitative indirect sandwich-type ELISA. For the detection step, specific monoclonal antibodies (Mabs; 10) were used as coating antibodies and rabbit polyclonal antibodies as probing antibodies. The presence of SEs was revealed by goat anti-rabbit immunoglobulins coupled to horseradish peroxidase and determined by a colorimetric measurement. The microtiter plates (Immulon II, Dynatech, Denkendorf, Germany) were coated with 50 μ L purified Mabs at concentrations of 5, 4, 10, and 2 μ g/mL for Mabs SEA to SED, respectively, in a phosphate-buffered saline (PBS) solution. A standard curve for each plate was generated by incubating 200 μ L SEA to SED (Toxin Technology) at a final concentration increasing from 0.0625 to 1 ng/mL (SEA and SED) and 0.250 to 4 ng/mL (SEB and SEC) in a PBS solution ($NaCl/Na_2HPO_4$: 145 mmol/L: 10 mmol/L, pH = 7.3 ± 0.3), 0.2% gelatin (Merck, Darmstadt, Germany), 0.1% Tween (PBS-Gelatin-Tween; PGT).

Homogeneity Testing

In order to ensure that the toxin was homogeneously dispersed in the samples, 10 vials were randomly taken from

each of the 3 batches (blank, low, and high levels). Each vial was analyzed in duplicate as follows: extraction followed by dialysis concentration and detection using Vidas SET2, Transia Plate SET kits, and CRL confirmatory method. Homogeneity was assessed by a one-way analysis of variance (ANOVA) test according to the ISO/IUPAC/AOAC international harmonized protocol (12).

Stability Testing

In order to ensure that the toxin was stable in the 2 types of samples (freeze-dried and ready-to-use), stability studies were performed according to the ISO 13528 Standard (13).

Stability Study of Freeze-Dried Samples

Between the homogeneity study (corresponding to week 0) and the sample dispatch (week 19), a stability study of the freeze-dried samples was performed over 21 weeks. Three samples at each time and for each batch were analyzed in duplicate at different times (weeks 0–4, 8, 13, 17, 20, and 21).

Stability Study of Ready-to-Use Concentrated Extracts

Before the ready-to-use concentrated protein extracts were sent, the stability of the low and high level batches was studied in 2 storage conditions: Three samples per batch were studied under Transia Plate SET and Vidas SET2 after an extraction step followed by dialysis concentration at different times (weeks 0–4) and stored at various temperatures [room temperature (RT), 4, and $-18^\circ C$]; one sample per level was submitted to an extraction step followed by dialysis concentration and stored at $4^\circ C$ for 8 days, and a Vidas SET2 detection was performed at days 0, 1, 4, 5, 7, and 8.

Statistical Analysis using Accordance and Concordance Parameters

Because the Vidas SET2 detection kit is a qualitative method, the classical statistical parameters of reproducibility and repeatability cannot be used. Accordance, concordance, and concordance odds ratio (COR) were used. These concepts were introduced to characterize the interlaboratory variability of qualitative methods (8) and then incorporated as an annex to the Standard EN ISO 16140 (6) on method validation in food microbiology. Accordance can be considered as an equivalent of repeatability and is the probability that 2 identical samples analyzed by the same laboratory under repeatability conditions will give the same result. Concordance can be considered as an equivalent of reproducibility and is the probability that 2 identical samples sent to different laboratories will give the same result. Because the magnitude of concordance and accordance depends largely on the trueness level, the COR is introduced as the following ratio:

$$COR = \frac{\text{accordance} * (100 - \text{concordance})}{\text{concordance} * (100 - \text{accordance})}$$

Table 1. Summary of data obtained using ANOVA for each level and detection method

Level	Detection method	Calculated <i>F</i> -value	Critical <i>F</i> -value	s_s/σ	σ (25%)	Interpretation
Blank	Transia Plate SET	0.647	3.02	ND ^a	ND	Homogeneous
Blank	Vidas SET2	0.747	3.02	ND	ND	Homogeneous
Low	Transia Plate SET	6.95	3.02	0.205	0.187	Homogeneous
Low	Vidas SET2	4.82	3.02	0.217	0.164	Homogeneous
High	Transia Plate SET	3.29	3.02	0.141	0.292	Homogeneous
High	Vidas SET2	19.58	3.02	0.159	0.295	Homogeneous

^a ND = Not done.

Results

Homogeneity Studies of the Freeze-Dried Samples

The purchased batch of Tomme de Savoie cheese was analyzed for the presence of SEs using both Transia Plate SET and Vidas SET2 detection methods. The analysis for SEs types A to E showed that this batch was free of these types of enterotoxins.

Homogeneity testing showed that the 3 level batches were homogeneous using both Transia Plate SET and Vidas SET2 detection methods.

Table 1 sums up the homogeneity data obtained for each level and for each detection method, whereas Table 2 gives a complete ANOVA example for the low level batch. The *F*-value (4.82) calculated was larger than the critical value at 5% (3.02). Therefore, ratio s_s/σ has to be considered as described in the IUPAC Protocol:

$$s_s/\sigma = 0.217$$

where σ (25%) = 0.164. As the ratio s_s/σ was <0.3, the low level batch could be considered as homogeneous.

Table 2. ANOVA test for homogeneity study of the low level batch using Vidas SET2 detection (*n* = 2)

Sample groups	Assay 1 (test value) ^a	Assay 2 (test value)	Sum	Mean	Variance
1	0.59	0.63	1.220	0.610	8.0E-04
2	0.65	0.63	1.280	0.640	2.0E-04
3	0.75	0.69	1.440	0.720	1.8E-03
4	0.64	0.61	1.250	0.625	4.5E-04
5	0.61	0.62	1.230	0.615	5.0E-05
6	0.69	0.68	1.370	0.685	5.0E-05
7	0.62	0.61	1.230	0.615	5.0E-05
8	0.67	0.67	1.340	0.670	00E+00
9	0.63	0.71	1.340	0.670	3.2E-03
10	0.7	0.71	1.410	0.705	5.0E-05
Overall mean				0.656	

ANOVA

Variations	Sum of squares	df ^b	Square mean	<i>F</i> -value	Probability	Critical <i>F</i> -value
Outside groups	0.02884	9	0.00320	4.81955	0.01098	3.02038
Inside groups	0.00665	10	0.00066			
s_s^2			0.00127			
s_s			0.03564			
σ (25 %)			0.16387			
s_s/σ			0.21746			
Total	0.03549	19				

^a Cut-off = 0.13.

^b df = Degree of freedom.

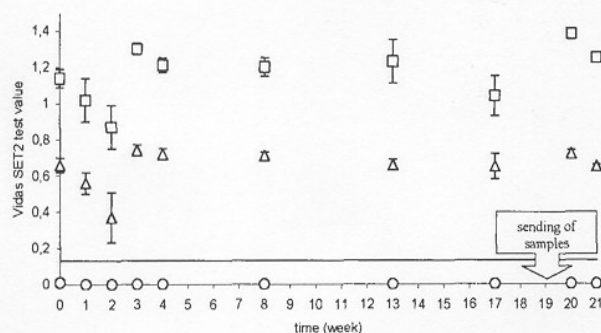


Figure 1. Stability of toxin in freeze-dried samples using Vidas SET2 detection kit. Spiking levels: (o) blank, (Δ) low, (\square) high, (—) cut-off.

Stability Study of Freeze-Dried Samples

In order to assess the stability of the spiked freeze-dried batches (Figure 1), a statistical analysis was conducted on results for the low and high level batches from week 3 to week 21. A batch could be considered as stable if $|\bar{x}_{3weeks} - \bar{x}_{21weeks}| \leq 0.3\sigma$. Results obtained before week 3 were not included in the statistical analysis because of the required stabilization time of freeze-dried samples, including temperature change from -18°C to RT leading to hydration of samples and packaging. Blank, low, and high level batches proved to be stable for at least 21 weeks (Table 3).

Stability Study of Ready-to-Use Concentrated Extracts

Results are presented in Figures 2 and 3. Figure 2 gives the stability of ready-to-use concentrated extracts using Vidas

SET2 detection kit in function of time and storage temperature (-18°C , 4°C , and RT), whereas Figure 3 gives the stability of ready-to-use concentrated extracts using Vidas SET2 detection kit over 8 days at 4°C . For the low and high levels, the extracts seemed to be more stable at -18°C than at 4°C and at RT (Figure 2). For the 3 temperatures, the values decreased during the first week of storage. This stability study using Vidas SET2 detection kit showed that the extracts were stable for at least 4 weeks even if the extracts were stored at -18°C .

In order to facilitate the dispatch of the extracts, a stability study was performed at 4°C for 8 days (Figure 3). This study showed that the extracts were stable at 4°C for 8 days after storage. After 8 days, the test value decreased to half of the initial value. The same study was conducted using a Transia Plate SET detection (data not shown) and the conclusions were similar. Given the outcome of this study, the extracts were stored at -18°C before dispatch, and the participants were instructed to keep them at 4°C after receipt and to analyze them as soon as possible.

Laboratory Results on the Ready-to-Use Concentrated Extracts

All but 2 participants (L3 and L4) strictly followed the recommended protocol. All participants obtained the expected results, showing no positive nor negative deviations (Table 4).

Laboratory Results on the Freeze-Dried Samples

All laboratories (except L4) performed the analysis between weeks 19 and 21, i.e., within the period of stability of the freeze-dried samples. All but 2 participants (L3 and L9) strictly followed the recommended protocol and obtained the expected results, indicating the absence of false-positive or -negative results (Table 5).

Table 3. Statistic results for stability study of the low and high level batch using Transia Plate SET and Vidas SET2 detection kits

	Low level		High level	
Transia Plate SET (OD at 450 nm)	$\bar{x}_{3weeks} = 0.664^a$	$\hat{\sigma} = 0.166^b$	$\bar{x}_{3weeks} = 1.219$	$\hat{\sigma} = 0.3048$
	$\bar{x}_{21weeks} = 0.685^c$	$0.3 \hat{\sigma} = 0.0498$	$\bar{x}_{21weeks} = 1.165$	$0.3 \hat{\sigma} = 0.0914$
	$ \bar{x}_{3weeks} - \bar{x}_{21weeks} = 0.021$		$ \bar{x}_{3weeks} - \bar{x}_{21weeks} = 0.054$	
	$0.021 < 0.3 \hat{\sigma}$		$0.054 < 0.3 \hat{\sigma}$	
	The samples can be considered as stable		The samples can be considered as stable	
Vidas SET2 (test value)	$\bar{x}_{3weeks} = 0.74$	$\hat{\sigma} = 0.185$	$\bar{x}_{3weeks} = 1.30$	$\hat{\sigma} = 0.325$
	$\bar{x}_{21weeks} = 0.71$	$0.3 \hat{\sigma} = 0.555$	$\bar{x}_{21weeks} = 1.25$	$0.3 \hat{\sigma} = 0.0975$
	$ \bar{x}_{3weeks} - \bar{x}_{21weeks} = 0.03$		$ \bar{x}_{3weeks} - \bar{x}_{21weeks} = 0.05$	
	$0.03 < 0.3 \hat{\sigma}$		$0.05 < 0.3 \hat{\sigma}$	
	The samples can be considered as stable		The samples can be considered as stable	

^a \bar{x}_{3weeks} = Mean of values obtained after 3 weeks of storage.

^b $\hat{\sigma}$ = Standard deviation of ability (25% of \bar{x}).

^c $\bar{x}_{21weeks}$ = Mean of values obtained after 21 weeks of storage.

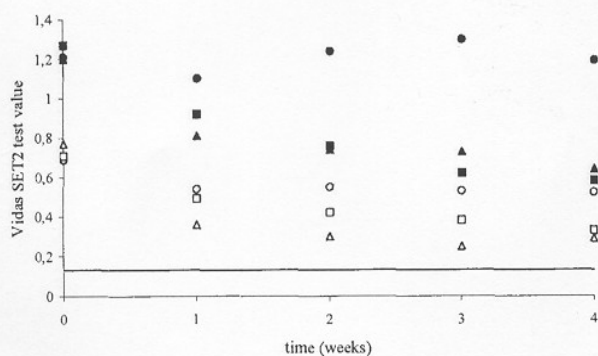


Figure 2. Stability of toxin in ready-to-use concentrated extracts using Vidas SET2 detection kit according to time and storage temperature: (○) low level at -18°C ; (□) low level at 4°C ; (△) low level at room temperature; (●) high level at -18°C ; (■) high level at 4°C ; (▲) high level at room temperature; (—) cut-off = 0.13.

Statistical Analysis: Accordance, Concordance, and Concordance Odds Ratio Parameters

A statistical analysis was performed on the data obtained by laboratories on freeze-dried samples. As all the laboratories obtained the expected results accordance, concordance, and COR were equal to 1, indicating that results were just as likely to be the same, regardless of whether the 2 samples were analyzed at the same or different laboratories.

Comments from Laboratories

Various comments were reported by participants. Several of them considered that the extraction step by dialysis was laborious, not easily applicable for routine analysis, expensive (for the dialysis bag), and time consuming (the method takes more than 24 h). However, laboratories reported that the detection step using Vidas SET2 made the analysis faster and easier.

Discussion

Detection of SEs in foods is often difficult due to their small amounts present in foods and to their nature. To date, 22 enterotoxins and/or enterotoxin-like types have been identified: enterotoxins A (SEA), B (SEB), C₁ (SEC₁), C₂ (SEC₂), C₃ (SEC₃), D (SED), E (SEE), G (SEG), H (SEH), I (SEI), J (SEIJ; 14), K (SEIK; 15), L (SEIL), M (SEIM), N (SEIN), O (SEIO; 16), P (SEIP; 17), Q (SEIQ; 18), R (SEIR; 19), U (SEIU; 20), U2 (SEIU2), and V (SEIV; 21).

Three types of methods are usually performed to detect bacterial toxins in food: bioassays, molecular biology, and/or immunological tools. Bioassays are based on the capacity of the food extract to induce symptoms such as vomiting, gastrointestinal symptoms in animals, and/or superantigenic action on cell cultures. Symptoms of staphylococcal food poisoning appear if the dose ingested by the animals is

>200 ng, which is higher than doses involved in human food poisoning (22, 23). Thus, besides restricting the use of laboratory animals for ethical reasons, those bioassays are not sensitive enough to ensure food safety for humans.

Methods based on molecular biology often involves a polymerase chain reaction (PCR). The technique detects genes encoding for enterotoxins of *S. aureus* isolated from contaminated foods. This tool gives an indication of the presence or absence of genes encoding for SEs but, in fact, gives no information on the expression of these genes during food production.

The third type of method and the most used for detection of SEs in foods is based on the use of specific polyclonal or Mabs against the enterotoxins. Commercially available tests are able to differentiate only 6 or 7 types of SEs (SEA, SEB, SEC₁, SEC₂, SEC₃, SED, and/or SEE) and others, such as Vidas SET2 or Transia Plate SET, do not differentiate them. None of these tests can detect other SEs (from SEG to SEIV), but those toxin forms may possibly cross-react with known antibodies raised against "classical" SEs.

Main tasks of the CRL for coagulase-positive staphylococci and their toxins are to select, develop, and/or validate analytical methods to be used for checks and official controls according to the Commission Regulation 2073/2005 (2), to transfer those methods to EU-NRLs, and to evaluate the ability of the EU-NRLs to practice these methods. Three types of interlaboratory comparisons can be conducted, depending on the goal to be achieved: proficiency testing whose aim is to evaluate a network of laboratories, the certification of reference materials where the purpose is to assign a value with its uncertainty to a given analyte in a given matrix, and the interlaboratory validation study which consists of an external validation of a method to estimate its within-laboratory and interlaboratory variability. This third type of study was conducted here to fully validate the Vidas SET2 detection kit. The homogeneity and stability studies performed on freeze-dried cheese for the detection of SEs in milk and milk products showed that this material could be satisfactorily used for such an interlaboratory study, because it proved to be homogeneous and stable over at least 21 weeks. The freeze-dried samples and the ready-to-use extracts were easily handled by the participants. The results obtained by all

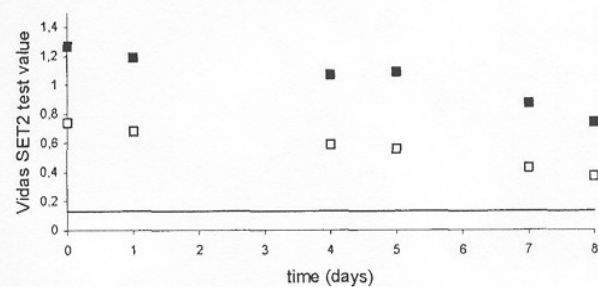


Figure 3. Stability of toxin in ready-to-use concentrated extracts using Vidas SET2 detection kit according to time at 4°C : (□) low level; (■) high level; (—) cut-off = 0.13.

Table 4. Qualitative results of laboratories for the ready-to-use concentrated extracts

Lab	Blank level		Low level		High level	
	Code sample	Lab results (expected -)	Code sample	Lab results (expected +)	Code sample	Lab results (expected +)
L1	10	-	302	+	81	+
L2	25	-	32	+	323	+
L3	96	-	122	+	265	+
L4	116	ND ^b	52	ND ^b	179	ND ^b
L5	182	-	144	+	61	+
L6	10	-	236	+	249	+
L7	195	-	216	+	156	+
L8	96	-	52	+	265	+
L9	25	-	302	+	61	+
L10	272	-	236	+	81	+
L11	195	-	122	+	249	+
L12	116	-	32	+	156	+
L13	182	-	216	+	179	+
L14	25	-	52	+	323	+
L15	272	-	144	+	156	+
L16	10	-	236	+	249	+
L17	96	-	32	+	265	+
L18	195	-	216	+	179	+
L19	182	-	144	+	61	+
L20	116	-	122	+	81	+
L21	10	-	216	+	81	+

^a ND = Not done; analysis not performed in duplicate.

^b ND = Not done; samples not tested.

the participating laboratories met the expected values, and the method showed a 100% sensitivity and specificity.

The outcome of the interlaboratory study confirms the satisfactory outcome of the preliminary study and the intralaboratory study performed previously (5). This intralaboratory study has shown that Vidas SET2 can be satisfactory used to detect SEs in a variety of milk-based matrixes. Therefore, the Vidas SET2 detection kit can be used as a detection method for SEs in milk and milk products for individual laboratory checks or official controls. Thus, NRLs may choose between the procedures, including dialysis concentration, pretreatment using rabbit IgG and Transia Plate SET detection, or dialysis concentration and Vidas SET2 detection.

Even if these 2 methods are satisfactory to check SE content in milk products, false-positive and -negative results can meanwhile occur due to the complexity of the matrix, including the type of milk used, the recently described SE types, and the critical points of the extraction step such as the precipitation of caseins and/or the recovery of the concentrated extract. Moreover, to date, both screening and

confirmatory methods are based on the same principle using antigen-antibody liaison. This leads to various drawbacks, including the availability of specific antibodies for all of the incriminated or suspected SEs. Thus, it could be interesting to develop, as for other types of contaminants, a confirmatory method using another principle such as liquid chromatography coupled to mass spectrometry.

Acknowledgments

We acknowledge the following collaborators for their participation in this interlaboratory validation study:

Johann Ladstatter, AGES-Institut für Lebensmitteluntersuchung, Wien, Austria

Koen De Reu, DVK-CLO Brusselsteenweg, Melle, Belgium

Patrick Genot, Agence Fédérale pour la Sécurité de la Chaîne Alimentaire (LFSA), Gembloux, Belgium

Constantinos Economides, Laboratory for the Control of Foods of Animal Origin, Nicosia, Cyprus

Carmen Blanco-Vidal, Agencia Espanola de Seguridad Alimentaria, Madrid, Spain

Table 5. Qualitative results of the laboratories for the 3 batches of freeze-dried samples

Lab code	Blank level						Low level						High level					
	Code sample	Lab results (expected -)	Code sample	Lab results (expected -)	Code sample	Lab results (expected +)	Code sample	Lab results (expected +)	Code sample	Lab results (expected +)	Code sample	Lab results (expected +)	Code sample	Lab results (expected +)	Code sample	Lab results (expected +)		
L1	2	-	-	192	-	-	47	+	+	226	+	+	155	+	+	253	+	+
L2	18	-	-	201	-	-	129	+	+	301	+	+	242	+	+	87	+	+
L3	5	-	ND ^a	187	-	ND ^a	54	+	ND ^a	308	+	ND ^a	164	+	ND ^a	246	+	ND ^a
L4	117	ND ^b		281	ND ^b		130	ND ^b		237	ND ^b		68	ND ^b		255	ND ^b	
L5	103	-	-	190	-	-	31	+	+	292	+	+	152	+	+	312	+	+
L6	24	-	-	273	-	-	58	+	+	128	+	+	159	+	+	247	+	+
L7	105	-	-	282	-	-	34	+	+	121	+	+	63	+	+	243	+	+
L8	112	-	-	197	-	-	136	+	+	232	+	+	70	+	+	162	+	+
L9	119	ND ^c		208	ND ^c		53	ND ^c		219	ND ^c		82	ND ^c		316	ND ^c	
L10	12	-	-	186	-	-	36	+	+	140	+	+	66	+	+	170	+	+
L11	91	-	-	275	-	-	38	+	+	224	+	+	269	+	+	89	+	+
L12	101	-	-	278	-	-	55	+	+	211	+	+	241	+	+	158	+	+
L13	3	-	-	109	-	-	46	+	+	138	+	+	245	+	+	79	+	+
L14	27	-	-	204	-	-	133	+	+	234	+	+	268	+	+	74	+	+
L15	95	-	-	200	-	-	40	+	+	294	+	+	313	+	+	174	+	+
L16	97	-	-	181	-	-	35	+	+	147	+	+	78	+	+	177	+	+
L17	15	-	-	279	-	-	139	+	+	233	+	+	320	+	+	73	+	+
L18	113	-	-	209	-	-	45	+	+	221	+	+	64	+	+	154	+	+
L19	94	-	-	104	-	-	213	+	+	126	+	+	76	+	+	180	+	+
L20	23	-	-	185	-	-	214	+	+	303	+	+	318	+	+	163	+	+
L21	6	-	-	202	-	-	230	+	+	124	+	+	326	+	+	71	+	+

^a ND = Not done; analysis not performed in duplicate.

^b ND = Not done; samples not tested.

^c ND = Not done; extraction step with dialysis concentration not used; trichloroacetic acid extraction used.

Zsusanna Srete-Lancz, National Food Investigation Institute, Budapest, Hungary

Anna Maria Ferrini, Istituto Superiore di Sanita (CNQARA), Rome, Italy

Karl Eckner, Norwegian Institute for Food and Environmental Analysis, Oslo, Norway

Wilma Jacobs-Reistma, Rikilt Institute of Food Safety, Wageningen, The Netherlands

Paul In't Velt, Food and Consumer Product Safety Authority Region South, Eindhoven, The Netherlands

Jolanta Rola, NVRI Department of Hygiene of Food of Animal Origin, Pulawy, Poland

Celcidina Pires-Gomes and Paula Alves, LNI, Lisboa, Portugal

Joerg Hummerjohann, Agroscope Liebefeld-Posieux (ALP), Bern

Marie-Claude Bauer, Laboratoire Départemental d'Analyses des Bouches du Rhône, Marseille, France

Eliane Rubert and Catherine Desfargues, LIAL Massif Central, Aurillac, France

Gilbert Montourcy, Laboratoire des Fromageries Occitanes, Saint Mamet, France

Nicolas Gaillard, Laboratoire de Touraine, Tours, France

Laurence Guiliani, Laboratoire Vétérinaire Départemental de l'Isère, Grenoble, France

Stéphanie Gornard, Laboratoire Vétérinaire Départemental de la Meuse, Bar le Duc, France

Jean-Louis Pittet, bioMérieux S.A., Marcy l'Étoile, France

References

- (1) European Commission DG-SANCO (2003) *Draft Opinion of the Scientific Committee on Veterinary Measures Relating to Public Health Staphylococcal enterotoxins in Milk Products Especially Cheeses*, 26-27/03, http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scv/out61_en.pdf
- (2) *Off. J. Eur. Commun.* (2005) **L 338**, 1-26, <http://europa.eu.int/eur-lex/en/index.html>
- (3) *Off. J. Eur. Commun.* (2006) **L 136**, 3-7, <http://europa.eu.int/eur-lex/en/index.html>
- (4) *Off. J. Eur. Commun.* (1992) **L 268**, 1-31, <http://europa.eu.int/eur-lex/en/index.html>

- (5) Hennekinne, J.A., Guillier, F., Perelle, S., De Buyser, M-L., Dragacci, S., Krys, S., & Lombard, B. (2006) *J. Appl. Microbiol.*, Online: 17-Oct-2006 doi:10.1111/j.1365-2672.2006.03183.x
- (6) International Organization for Standardization EN 16140 (2003) *Food Microbiology, Validation of Alternative Methods*, ISO, Geneva, Switzerland
- (7) Hennekinne, J.A., Gohier, M., Maire, T., Lapeyre, C., Lombard, B., & Dragacci, S. (2003) *J. AOAC Int.* **86**, 332–339
- (8) Langton, S.D., Chevennement, R., Nagelkerke, N., & Lombard, B. (2002) *Int. J. Food. Microbiol.* **79**, 175–181
- (9) Normanno, G., Firinu, A., Virgilio, S., Mula, G., Dambrosio, A., Poggiu, A., Decastelli, L., Mioni, R., Scuota, S., Bolzoni, G., Di Giannatale, E., Salinetti, A.P., La Salandra, G., Bartoli, M., Zuccon, F., Pirino, T., Sias, S., Parisi, A., Quaglia, N.C., & Celano, G.V. (2005) *Int. J. Food Microbiol.* **98**, 73–79
- (10) Lapeyre, C., Janin, F., & Kaveri, S.V. (1988) *Food Microbiol.* **5**, 25–31
- (11) Macaluso, L., & Lapeyre, C. (2000) *Analisis* **28**, 610–615
- (12) ISO/IUPAC/AOAC (1993) *J. AOAC Int.* **76**, 926–940
- (13) International Organization for Standardization 13528 (2006) *Complements ISO Guide 43, Statistical Methods for Use in Proficiency Testing by Interlaboratory Comparisons*, ISO, Geneva, Switzerland
- (14) Balaban, N., & Rasooly, A. (2000) *Int. J. Food Microbiol.* **61**, 1–10
- (15) Orwin, P.M., Leung, D.Y.M., Donahue, H.L., Novick, R.P., & Schlievert, P.M. (2001) *Infect. Immun.* **69**, 360–366
- (16) Jarraud, S., Peyrat, M.A., Lim, A., Tristan, A., Bes, M., Mougel, C., Etienne, J., Vandenesch, F., Bonneville, M., & Lina, G. (2001) *J. Immunol.* **166**, 669–677
- (17) Omoe, K., Imanishi, K., Hu, D.L., Kato, H., Fugane, Y., Abe, Y., Hamaoka, S., Watanabe, Y., Nakane, A., Uchiyama, T., & Shinagawa, K. (2005) *Infect. Immun.* **73**, 5540–5546
- (18) Orwin, P.M., Leung, D.Y.M., Tripp, T.J., Bohach, G.A., Earhart, C.A., Ohlendorf, D.H., & Schlievert, P.M. (2002) *Biochemistry* **41**, 14033–14040
- (19) Omoe, K., Hu, D.L., Takahashi-Omoe, H., Nakane, A., & Shinagawa, K. (2003) *Infect. Immun.* **71**, 6088–6094
- (20) Letertre, C., Perelle, S., Dilasser, F., & Fach, P. (2003) *J. Appl. Microbiol.* **95**, 38–43
- (21) Thomas, D.Y., Jarraud, S., Lemerrier, B., Cozon, G., Echasserieau, K., Etienne, J., Gougeon, M.L., Lina, G., & Vandenesch, F. (2006) *Infect. Immun.* **74**, 4724–4734
- (22) Asao, T., Kumeda, Y., Kawai, T., Shibata, T., Oda, H., Haruki, K., Nakazawa, H., & Kozaki, S. (2003) *Epidemiol. Infect.* **130**, 33–40
- (23) Ikeda, T., Tamate, N., Yamaguchi, K., & Makino, S. (2005) *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 2793–2795

Références bibliographiques

- Aebersold, R., Mann, M., 2003. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*, 422, 198-207.
- Akhtar, M., Park, C. E., Rayman, K., 1996. Effect of urea treatment on recovery of staphylococcal enterotoxin A from heat-processed foods. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 9, 3274-3276.
- Akineden, O., Annemuller, C., Hassan, A. A., Lammler, C., Wolter, W., Zschock, M., 2001. Toxin genes and other characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from milk of cows with mastitis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 8, 5, 959-964.
- Akineden, O., Hassan, A. A., Schneider, E., Usleber, E., 2008. Enterotoxigenic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from goats' milk cheese. *Int. J. Food Microbiol.*, 124, 2, 211-216.
- Alarçon, B., Vicedo, B., Aznar, R., 2006. PCR-based procedures for detection and quantification of *Staphylococcus aureus* and their application in food. *J. Appl. Microbiol.*, 100, 2, 352-354.
- Alomar, J., Lebert, A., Montel, M.C., 2008. Effect of temperature and pH on growth of *Staphylococcus aureus* in co-culture with *Lactococcus garvieae*. *Curr. Microbiol.*, 56, 4, 408-412.
- Altboum, Z., Hertman, I., Sarid, S., 1985. Penicillinase plasmid-linked genetic determinants for enterotoxins B and C1 production in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.*, 47, 2, 514-521.
- Anderson, K.L., Roberts, C., Disz, T., Vonstein, V., Hwang, K., Overbeek, R., Olson, P.D., Projan, S. J., Dunman, P.M., 2006. Characterization of the *Staphylococcus aureus* heat shock, cold shock, stringent, and SOS responses and their effects on log-phase mRNA turnover. *J. Bacteriol.*, 188, 19, 6739-6756.
- Andrews, G.P., Martin, S.E., 1978. Modified Vogel-Johnson agar for *Staphylococcus aureus*. *J. Appl. Bacteriol.*, 41, 530-532.
- Anonyme, 1997. Outbreak of staphylococcal food poisoning associated with precooked ham, *Morb. Mort. Wkly. Rep.*, 46, 50, 1189-1191.
- Anonyme, 1999a. NF EN ISO 6888-1. Microbiologie des aliments – Méthode horizontale pour le dénombrement des staphylocoques à coagulase positive (*Staphylococcus aureus* et autres espèces) – Partie 1 : Technique utilisant le milieu gélosé de Baird-Parker.
- Anonyme, 1999b. NF EN ISO 6888-2. Microbiologie des aliments – Méthode horizontale pour le dénombrement des staphylocoques à coagulase positive (*Staphylococcus aureus* et autres espèces) – Partie 2 : Technique utilisant le milieu gélosé au plasma de lapin et au fibrinogène.
- Anonyme, 2000. Surveillance for foodborne disease outbreaks - United States, 1993-1997. *Morb. Mort. Wkly. Rep.*, 49, 1-51.
- Anonyme, 2001. Staphylococcus food poisoning in Japan. *Infect. Agents Surv. Rep.*, 22, 185-186.
- Anonyme, 2003a. Opinion of the scientific committee on veterinary measures relating to public health on staphylococcal enterotoxins in milk products, particularly cheeses. SCVPH plenary meeting, March 27-28. : www.europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scv/out61_en.pdf.

Anonyme, 2003b. NF EN ISO 6888-3. Microbiologie des aliments – Méthode horizontale pour le dénombrement des staphylocoques à coagulase positive (*Staphylococcus aureus* et autres espèces) – Partie 3 : Recherche et méthode NPP pour les faibles nombres.

Anonyme, 2003c. NF EN ISO 16140. Microbiologie des aliments -- Protocole pour la validation des méthodes alternatives

Anonyme, 2003d. Directive 2003/99/CE du Parlement européen et du Conseil. JOCE du 12 décembre 2003, L 325, 31.

Anonyme, 2004. Note de service de la Direction Générale de l'Alimentation. NS/DGAL/SDSSA/N2004-8193 du 28 juillet 2004.

Anonyme, 2005a. Règlement CE N°2073/2005 de la Commission du 15 novembre 2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires. JOCE du 22 décembre 2005, L328, 1-36.

Anonyme, 2005b. NF/EN ISO CEI 17025. Prescriptions générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnage et d'essais.

Anonyme, 2005c. NF EN ISO 22174. Microbiologie des aliments – Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) pour la recherche de micro-organismes pathogènes dans les aliments – Exigences générales et définitions.

Anonyme, 2006a. NF EN ISO 20837. Microbiologie des aliments – Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) pour la recherche de micro-organismes pathogènes dans les aliments – Exigences relatives à la préparation des échantillons pour la détection qualitative.

Anonyme, 2006b. NF EN ISO 20838. Microbiologie des aliments – Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) pour la recherche de micro-organismes pathogènes dans les aliments – Exigences relatives à l'amplification et à la détection pour les méthodes qualitatives.

Anonyme, 2006c. The Community Summary Report 2005 : Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents, Antimicrobial Resistance and Foodborne Outbreaks in the European Union in 2005. The EFSA Journal, 94, 1-236.

Anonyme, 2006d. Surveillance for foodborne-disease outbreaks - United States, 1998-2002. Morb. Mort. Wkly. Rep., 55, 1-42.

Anonyme, 2006e. Note de service de la Direction Générale de l'Alimentation NS/DGAL/SDSSA/N2006-8048 du 20 février 2006 relative à l'entrée en application du règlement (CE) n°2073/2005 du 15 novembre 2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires.

Anonyme, 2006f. Note de service de la Direction Générale de l'Alimentation NS/DGAL/SDSSA/N2006-8210 du 23 août 2006 relative aux techniques de détection des entérotoxines staphylococciques dans les produits laitiers.

Anonyme, 2006g. Règlement CE N°776/2006 du 23 mai 2006 définissant la liste des Laboratoires Communautaires de Référence pour les différents critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires. JOCE du 25 mai 2006, L136, 3-8.

Anonyme, 2007a. Note de service de la Direction Générale de l'Alimentation NS/DGAL/SDSSA/N2007-8267 du 30 octobre 2007 relatives à la recherche des entérotoxines staphylococciques dans les échantillons autres que les produits laitiers.

Anonyme, 2007b. The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents, Antimicrobial Resistance and Foodborne Outbreaks in the European Union in 2006, The EFSA Journal, 130, 1-310.

Anonyme, 2007c. Règlement CE N°1441/2007 de la Commission du 5 décembre 2007 modifiant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires. JOCE du 7 décembre 2007, L322, 12-29.

Arbuthnott, J., Coleman, D., Deazavedo, J., 2000. Staphylococcal toxins in human disease. J. Appl. Bacteriol., 101S-107S.

Asao, T., Kumeda, Y., Kawai, T., Shibata, T., Oda, H., Haruki, K., Nakazawa, H., Kozaki, S., 2003. An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. Epidemiol. Infect., 130, 33-40.

Balaban, N., Rasooly, A., 2000. Staphylococcal enterotoxins. Int. J. Food Microbiol., 61, 1, 1-10.

Bania, J., Dabrowska, A., Bystron, J., Korzekwa, K., Chrzanowska, J., Molenda, J., 2006. Distribution of newly described enterotoxin-like genes in *Staphylococcus aureus* from food. Int. J. Food Microbiol., 108, 36-41.

Baird-Parker, A.C., 1962. An improved diagnostic and selective medium for isolating coagulase positive staphylococci. J. Appl. Bacteriol., 25, 12-19.

Barber, M.A., 1914. Milk poisoning due to a type of *Staphylococcus albus* occurring in the udder of a healthy cow. Philipp. J. Sci., 9, 515-519.

Bautista, L., Gaya, P., Medina, M., Nunez, M., 1988. A quantitative study of enterotoxin production by sheep milk staphylococci. Appl. Environ. Microbiol., 54, 2, 566-569.

Bayles, K.W., Landolo, J.J., 1989. Genetic and molecular analysis of gene encoding staphylococcal enterotoxin D. J. Bacteriol., 171, 4799-4806.

Becker, K., Keller, B., Von Eiff, C., 2001. Enterotoxigenic potential of *Staphylococcus intermedius*. Appl. Environ. Microbiol., 67, 5551-5557.

Beckers, H.J., Van Leusden, F.M., Bindschedler, O., Guerraz, D., 1984. Evaluation of a pour plate system with rabbit plasma-bovine plasma-agar for the enumeration of *Staphylococcus aureus* in food. Can. J. Microbiol., 30, 470-474.

Bennett, R.W., 2005. Staphylococcal enterotoxin and its rapid identification in foods by enzyme-linked immunosorbent assay-based methodology. J. Food Prot., 68, 6, 1264-1270.

Belay, N., Rasooly, A., 2002. *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin A production in an anaerobic environment. J. Food Prot., 65, 199-204.

- Bergdoll, M.S., Surgalla, M.J., Dack, G.M., 1959. Staphylococcal enterotoxin : identification of a specific precipitating antibody with enterotoxin neutralizing property. *J. Immunol.*, 83, 334-338.
- Bergdoll, M.S., Borja, C.R., Avena, R.M., 1965. Identification of a new enterotoxin as enterotoxin C. *J. Bacteriol.*, 90, 5, 1481-1485.
- Bergdoll, M.S., 1979. Staphylococcal intoxications. In: Riemann H, Bryan FL. Food-borne infections and intoxications. Academic press New York, 443-494.
- Bergdoll, M.S., Crass, B.A., Reiser, R.F., 1981. A new staphylococcal enterotoxin, enterotoxin F, associated with toxic-shock-syndrome *Staphylococcus aureus* isolates. *Lancet*. 1, 1017-1021.
- Bergdoll, M.S., 1983. Enterotoxins. In: Easmon, C.S.F., Adlam, C. (eds). *Staphylococci and staphylococcal infections*. Vol. 2, pp. 560-98. Academic Press, London.
- Bergdoll, M.S., 1988. Monkey feeding test for staphylococcal enterotoxins. *Methods Enzymol.*, 165, 324-333.
- Bergdoll, M.S., 1991. Symposium on microbiology update: old friends and new enemies. *Staphylococcus aureus*. *Int. JAOAC.*, 74, 706-710.
- Berrada, H., Soriano, J.M., Manes, J., Pico, Y., 2006. Real-time quantitative PCR of *Staphylococcus aureus* and application in restaurant meals. *J. Food Prot.*, 69, 1, 106-111.
- Betley, M.J., Mekalanos, J.J., 1985. Staphylococcal enterotoxin A is encoded by a phage. *Science*, 229, 185-187.
- Betley, M.J., Mekalanos, J.J., 1988. Nucleotide sequence of the type A staphylococcal enterotoxin gene. *J Bacteriol.*, 170, 1, 34-41.
- Beynon, R.J., Doherty, M.K., Pratt, J.M., Gaskell, S.J., 2005. Multiplexed absolute quantification in proteomics using artificially QCAT proteins of concatenated signature peptides. *Nat. Methods*, 2, 587-589.
- Blaiotta, G., Ercolini, D., Fusco, U., Casaburi, A., Pepe, O., Villani, F., 2004. PCR detection enterotoxin genes in *Staphylococcus spp.* strain isolated from meat and dairy products. Evidence of new variants of *seG* and *sel* in *S. aureus* AB8802. *J. Appl. Microbiol.*, 97, 719-730.
- Blair, J.E., Williams, R.E., 1961. Phage-typing of staphylococci. *Bull. W.H.O.*, 24, 771-784.
- Blomster-Hautamaa, D.A., Kreiswirth, B.N., Kornblum, J.S., 1986. The nucleotide and partial amino acid sequence of toxin shock syndrome toxin-1. *J. Biol. Chem.*, 261, 15783-15786.
- Bohach, G.A., Schlievert, P.M., 1987. Nucleotide sequence of the staphylococcal enterotoxin C1 gene and relatedness to other pyrogenic toxins. *Mol. Gen. Genet.*, 209, 15-20.
- Bohach, G.A., Schlievert, P.M., 1989. Conservation of the biological active portions of staphylococcal enterotoxins C1 and C2. *Infect. Immun.*, 57, 2249-2252.

- Bore, E., Langsrud, S., Langsrud, O., Rode, T.M., Holck, A., 2007. Acid-shock responses in *Staphylococcus aureus* investigated by global gene expression analysis. *Microbiology*, 153, Pt7, 2289-2303.
- Borst, D.W., Betley, M.J., 1994. Phage-associated differences in staphylococcal enterotoxin A gene (*sea*) expression correlate with with sea allele class. *Infect. Immun.*, 62, 113-118.
- Boutonnier, A., Nato, F., Bouvet, A., Lebrun, L., Audurier, A., Mazie, J. C., Fournier, J. M., 1989. Direct testing of blood culture for detection of the serotype 5 and 8 capsular polysaccharides of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.*, 27, 5, 989-993.
- Brun, V., Dupuis, A., Adrait, A., Marcellin, M., Thomas, D., Court, M., Vandenesch, F., Garin, J., 2007. Isotope-labelled protein standards: toward absolute quantitative proteomics. *Mol Cell Proteomics*, 6, 12, 2139-2149.
- Bryan, F., Guzewich, J., Todd, E., 1997. Surveillance of foodborne disease II. Summary and presentation of descriptive data and epidemiologic patterns; their value and limitations. *J. Food Prot.*, 60, 567-578.
- Carol, J., Gorseling, M., De Jong, C.F., Lingerman, H., Kientz, C.E., Van Baar, B.L., Irth, H., 2005. Determination of denatured proteins and biotoxins by on-line size-exclusion chromatography-digestion-liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*, 346, 150-157.
- Casman, E.P., Bennett, R.W., Dorsey, A.E., Stone, J.E., 1969. The micro-slide gel double diffusion test for the detection and assay of staphylococcal enterotoxins. *Health Lab. Sci.*, 6, 4, 185-198.
- Cha, J.O., Lee, J.K., Jung, Y.H., Yoo, J.I., Park, Y.K., Kim, B.S., Lee, Y.S., 2006. Molecular analysis of *Staphylococcus aureus* isolates associated with staphylococcal food poisoning in South Korea. *J. Appl. Microbiol.*, 101, 864-871.
- Chang, H.C., Bergdoll, M.S., 1979. Purification and some physicochemical properties of staphylococcal enterotoxin D. *Biochemistry*, 18, 1937-1942.
- Chapman, G.H., 1945. The significance of sodium chloride in studies of Staphylococci. *J. Bacteriol.*, 50, 201-203.
- Charlier, C., Cretenet, M., Even, S., Le Loir, Y., 2008. Interactions between *Staphylococcus aureus* and lactic acid bacteria: An old story with new perspectives. *Int. J. Food Microbiol.*, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2008.06.032.
- Chen, T.R., Chiou, C.S. Tsen, H.Y., 2004. Use of novel PCR primers specific to the genes of staphylococcal enterotoxin G, H, I for the survey of *Staphylococcus aureus* strains isolated from food-poisoning cases and food samples in Taiwan. *Int. J. Food Microbiol.*, 92, 2, 189-197.
- Cheung, A.L., Koomey, J.M., Butler, C.A., 1992. Regulation of exoprotein expression in *Staphylococcus aureus* by a locus (*sar*) distinct from *agr*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 6462-6466.
- Chiang, Y.C., Chang, L.T., Lin, C.W., Yang, C.Y., Tsen, H. Y., 2006. PCR primers for the detection of staphylococcal enterotoxins K, L, and M and survey of staphylococcal enterotoxin types in *Staphylococcus aureus* isolates from food poisoning cases in Taiwan. *J Food Prot.*, 72, 5, 1072-1079.

Chiang, Y.C., Liao, W.W., Fan, C.M., Pai, W.Y., Chiou, C.S., Tsen, H.Y., 2008. PCR detection of Staphylococcal enterotoxins (SEs) N, O, P, Q, R, U, and survey of SE types in *Staphylococcus aureus* isolates from food-poisoning cases in Taiwan. *Int J Food Microbiol.*, 121, 1, 66-73.

Coleman, D. C., Sullivan, D. J., Russell, R. J., Arbuthnott, J. P., Carey, B. F., Pomeroy, H. M., 1989. *Staphylococcus aureus* bacteriophages mediating the simultaneous lysogenic conversion of beta-lysin, staphylokinase and enterotoxin A : molecular mechanism of triple conversion. *J. Gen. Microbiol.*, 135, 6, 1679-1697.

Couch, J.L., Soltis, M.T., Betley, M.J., 1988. Cloning and nucleotide sequence of type E staphylococcal enterotoxin gene. *J. Bacteriol.*, 170, 2954-2960.

Cunha Mde, L., Calsolari, R.A., Junior, J.P., 2007. Detection of enterotoxin and toxic shock syndrome toxin 1 genes in *Staphylococcus*, with emphasis on coagulase negative staphylococci. *Microbiol. Immunol.*, 51, 4, 381-390.

Dack, G.M., Cary, W.E., Woolpert, O., Wiggers, H., 1930. An outbreak of food poisoning proved to be due to a yellow hemolytic staphylococcus. *J. Prev. Med.*, 4, 167-175.

Davies, J.A., Farrah, S.R., Wilkie, A.C., 2006. Selective growth of *Staphylococcus aureus* from flushed dairy manure wastewater using acriflavine-supplemented mannitol salt agar. *Lett. Appl. Microbiol.*, 42, 6, 606-611.

De Buyser, M.L., Morvan, A., Grimont, F., el Solh, N., 1989. Characterization of *Staphylococcus* species by ribosomal RNA gene restriction patterns. *J Gen Microbiol.*, 135, 4, 989-999.

De Buyser, M.L., Audinet, N., Delbart, M.O., Maire, M., Françoise, F. 1998. Comparison of selective culture media to enumerate coagulase-positive staphylococci in cheeses made from raw milk. *Food Microbiol.*, 15, 339-346.

De Buyser, M.L., Dufour, B., Maire, M., Lafarge, V., 2001. Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries. *Int. J. Food Microbiol.*, 67, 1-17.

De Buyser, M.L., Lombard, B., Schulten, S.M., In't Veld, P., Scotter, S.L., Rollier, P., Lahellec, C., 2003. Validation of EN ISO standard methods 6888 Part 1 and Part 2 : 1999- Enumeration of coagulase-positive staphylococci in foods. *Int. J. Food Microbiol.*, 83, 185-194.

De Buyser, M.L., Sutra, L., 2005. *Staphylococcus aureus*. In : Federighi M. Bactériologie alimentaire - Compendium d'hygiène des aliments. Economica, Paris, 25-51.

De la Fuente, R, Suarez, G, Schleifer, K.H., 1985. *Staphylococcus aureus subsp. Anaerobius subsp. nov.*, the causal agent of abscess disease of sheep. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 99-102.

Delbes, C., Alomar, J., Chougui, N., Martin, J.F., Montel, M.C., 2006. *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin production during the manufacture of uncooked, semihard cheese from cows' raw milk. *J. Food Prot.*, 69, 9, 2161-2167.

Delmas, G., Gallay, A., Espié, A., Haeghebaert, S., Pihier, N., Weill, F.X., De Valk, H., Vaillant, V., Désenclos, J.C., 2006. Les toxi-infections alimentaires collectives en France entre 1996 et 2005. *BEH*, 51-52, 418-422.

- Denys, J., 1894. Présence de Staphylocoque dans une viande qui a déterminé des cas d'empoisonnement. Bull. Acad. Roy. Med. Belg., 8, 496.
- Devoyod, J.J., Millet, L., 1976. Un milieu gélosé pour le dénombrement direct de *Staphylococcus aureus* : milieu au plasma de porc pour *S. aureus* (PPSA). Can. J. Microbiol., 22, 1603-1611.
- Devriese, L.A., 1981. Baird-Parker medium supplemented with acriflavine, polymyxins and sulphonamide for the selective isolation of *Staphylococcus aureus* from heavily contaminated materials. J. Appl. Bacteriol., 50, 351-357.
- Devriese, L.A., Vancanneyt, M., Baele, M., Vanechoutte, M., De Graef, E., Snauwaert, C., Cleenwerck, I., Dawyndt, P., Swings, J., Decostere, A., Haesebrouck, F., 2005. *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase-positive species from animals. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 55, Pt4, 1569-73.
- Dickie, N., Aktar, M., 1989. Concentration of staphylococcal enterotoxin from food extract using copper chelate sepharose. J. Food Prot., 52, 903-905.
- Diep, B. A., Carleton, H. A., Chang, R. F., Sensabaugh, G. F., Perdreau-Remington, F., 2006. Roles of 34 virulence genes in the evolution of hospital- and community-associated strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J. Infect. Dis., 193, 11, 1495-1503.
- Dinges, M.M., Orwin, P.M., Schlievert, P.M., 2000. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. Clin. Microbiol. Rev., 13, 16-34.
- Dupuis, A., Hennekinne, J.A., Garin, J., Brun, V., 2008. Protein Standard Absolute Quantification (PSAQ) for improved investigation of staphylococcal food poisoning outbreaks. Proteomics. 8, 22, 4633-4636.
- Ellner, P.D., Stoessel, C.J., Drakeford, E., Vasi, F., 1966. A new culture medium for medical bacteriology. American J. Clin. Pathol., 45, 502-504.
- Ende, I.A., Terplan, G., Kickhofen, B., Hammer, D.K., 1983. Chromatofocusing : a new method for purification of staphylococcal enterotoxins B and C1. Appl. Environ. Microbiol., 46, 6, 1323-1330.
- Ercolini, D., Blaiotta, G., Fusco, V., Coppola, S., 2004. PCR-based detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in the early stages of raw milk cheese making. J. Appl. Microbiol., 96, 5, 1090-1096.
- Evenson, M.L., Hinds, M.W., Bernstein, R.S., Bergdoll, M.S., 1988. Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. Int. J. Food Microbiol., 7, 311-316.
- Ewald, S., Notermans, S., 1988. Effect of water activity on growth and enterotoxin D production of *Staphylococcus aureus*. Int. J. Food Microbiol., 6, 25-30.
- Fischer, A., von Eiff, C., Kuczus, T., Omoe, K., Peters, G., Becker, K., 2007. A quantitative real-time immuno-PCR approach for detection of staphylococcal enterotoxins. J Mol Med., 85, 5, 461-469.

- Fitzgerald, J.R., Monday, S.R., Foster, T.J., 2001. Characterization of a putative pathogenicity island from bovine *Staphylococcus aureus* encoding multiple antigens. J. Clin. Microbiol., 183, 63-70.
- Gaillot, O., Wetsch, M., Fortineau, N., Berche, P., 2000. Evaluation of CHROMagar Staph. aureus, a new chromogenic medium for isolation and presumptive identification of *Staphylococcus aureus* from human clinical specimens. J. Clin. Microbiol., 38, 4, 1587-1591.
- Garfin, D.E., 2003. Two-dimensional gel electrophoresis : an overview. Trends Anal. Chem., 22, 5, 263-272.
- Genigeorgis, C.A., 1989. Present state of knowledge on staphylococcal intoxication. Int. J. Food Microbiol., 9, 327-360.
- Gerber, S.A., Rush, J., Stemman, O., Kirschner, M.W., Gygi, S.P., 2003. Absolute quantification of proteins and phosphoproteins from cell lysates by tandem MS. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 100, 6940-6945.
- Goto, M., Takahashi, H., Segawa, Y., Hayashidani, H., Takatori, K., Hara-Kudo, Y., 2007. Real-time PCR method for quantification of *Staphylococcus aureus* in milk. J. Food Prot., 70, 1, 90-96.
- Greenfield, R.A., Brown, B.R., Hutchins, J.B., landolo, J.J., Jackson, R., Slater, L.N., Bronze, M.S., 2002. Microbiological, biological, and chemical weapons of warfare and terrorism. Am. J. Med. Sci., 323, 6, 326-340.
- Halpin-Dohnalek, M.I., Marth, E.H., 1989. *Staphylococcus aureus*: production of extracellular compounds and behavior in foods – a review. J. Food Prot., 52, 267-82.
- Harvey, J., Gilmour, A., 2000. *Staphylococcus aureus*. In: Batt CA, Patel PD. Encyclopedia of Food. Academic Press, London, 2066-2071.
- Hawryluk, T., Hirshfield, I., 2002. A super antigen bioassay to detect staphylococcal enterotoxin A. J. Food Prot. , 65, 7, 1183-1187.
- Hedstrom, M., Andersson, M., Galaev, I.Y., Mattiasson, B., 2005. Fast on-column protein digestion with subsequent peptide mapping using tandem mass spectrometry with information dependant acquisition. J. Chromatogr. A., 1080, 2, 117-123.
- Hein, I., Lehner, A., Rieck, P., Klein, K., Brandl, E., Wagner, M., 2001. Comparison of different approaches to quantify *Staphylococcus aureus* cells by real-time quantitative PCR and application of this technique for examination of cheese. Appl. Environ. Microbiol., 67, 7, 3122-3126.
- Hein, I., Jorgensen, H.J., Loncarevic, S., Wagner, M., 2005. Quantification of *Staphylococcus aureus* in unpasteurised bovine and caprine milk by real-time PCR. Res. Microbiol, 156, 4, 554-63.
- Hennekinne, J-A, 2009a. Croissance de *S. aureus* et production d'entérotoxines : du bon respect de la chaîne du froid pour éviter les épisodes toxiques alimentaires. Revue générale du froid et du conditionnement d'air, Janvier/février 2009, 57-61.

Hennekinne, J.A., Brun, V., De Buyser, M.L., Dupuis, A., Ostyn, A., Dragacci, S., 2009b. Innovative contribution of mass spectrometry to characterise staphylococcal enterotoxins involved in food outbreaks. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75, 3, 882-884.

Hennekinne, J.A., Guillier, F., Perelle, S., De Buyser, M.L., Dragacci, S., Lombard, B., Krys, S., 2007a. Intra-laboratory validation of the Vidas SET2 detection kit in milk products according to the EN ISO 16140 standard. *J. Appl. Microbiol.* 102, 1261–1272.

Hennekinne, J.A., Ostyn, A., Guillier, F., Gohier, M., Messio, S., Dragacci, S., Krys, S., Lombard, B., 2007b. Interlaboratory validation of the Vidas SET2 detection kit for an use in official controls of staphylococcal enterotoxins detection in milk products especially low-fat cheeses. *J. AOAC Int.*, 90, 3, 756-764.

Hennekinne, J.A., Kerouanton, A., Brisabois, A., De Buyser, M.L., 2003. Discrimination of *Staphylococcus aureus* biotypes by pulsed-field gel electrophoresis of DNA macro-restriction fragments. *J. Appl. Microbiol.*, 86, 2, 321-329.

Hovde, C.J., Hackett, S.P., Bohach, G.A., 1990. Nucleotide sequence of the staphylococcal enterotoxin C3 gene : sequence comparison of all three type C staphylococcal enterotoxins. *Mol. Gen. Genet.*, 220, 329-333.

Hovde, C.J., Marr, J.C., Hoffmann, M.L., Hackett, S.P., Chi, Y.I., Crum, K.K., Stevens, D.L., Stauffacher, C.V., Bohach, G.A., 1994. Investigation of the role of the disulphide bond in the activity and structure of staphylococcal enterotoxin C1. *Mol. Microbiol.*, 13, 5, 897-909.

Hu, D.L., Omoe, K., Shimura, H., Ono, K., Sugii, S., Shinagawa, K., 1999. Emesis in the shrew mouse (*Suncus murinus*) induced by peroral and intraperitoneal administration of staphylococcal enterotoxin A. *J. Food Prot.*, 62, 11, 1350-1353.

Hu, D.L., Omoe, K., Shimoda, Y., Nakane, A., Shinagawa, K., 2003. Induction of emetic response to staphylococcal enterotoxins in the house musk shrew (*Suncus murinus*). *Infect. Immun.*, 71, 1, 567-570.

Hu, D.L., Zhu, G., Mori, F., Omoe, K., Okada, M., Wakabayashi, K., Kaneko, S., Shinagawa, K., Nakane, A., 2007. Staphylococcal enterotoxin induces emesis through increasing serotonin release in intestine and it is downregulated by cannabinoid receptor 1. *Cell. Microbiol.*, 9, 9, 2267-2277.

Huang, I.Y., Bergdoll, M.S., 1970. Primary structure of staphylococcal enterotoxin B. I. Isolation, composition, and sequence of tryptic peptides from oxidized enterotoxin B. *J. Biol. Chem.*, 245, 14, 3493-3510.

Huang, I.Y., Hughes, J.L., Bergdoll, M.S., 1987. Complete amino acid sequence of staphylococcal enterotoxin A. *J. Biol. Chem.*, 262, 7006-7013.

Hwang, S.Y., Kim, S.H., Jang, E.O., Kwon, N.H., Park, Y.K., Koo, H.C., Jung, W.K., Kim, J.M., Park, Y.H., 2007. Novel multiplex PCR for the detection of the *Staphylococcus aureus* superantigen and its application to raw meat isolates in Korea. *Int. J. Food Microbiol.*, 117, 99-105.

Ichiyama, S, Ohta, M., Shimokata, K., Kato, N., Takeuchi, J., 1991. Genomic DNA fingerprinting by pulsed-field gel electrophoresis as an epidemiological marker for study of nosocomial infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.*, 29, 2690-2695.

- Ikeda, T., Tamate, N., Yamaguchi, K., Makino, S., 2005. Mass outbreak of food poisoning disease caused by small amounts of staphylococcal enterotoxins A and H. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, 2793-2795.
- Ishihama, Y., Oda, Y., Tabata, T., Sato, T., Nagasu, T., Rappsilber, J., Mann, M., 2005. Exponentially modified protein abundance index (emPAI) for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein. *Mol. Cell. Proteomics*, 4, 9, 1265-1272.
- Isigidi, B.K., Devriese, L.A., Croegart, T.H., van Hoof, J., 1989. A highly selective two-stage isolation method for the enumeration of *Staphylococcus aureus* in foods. *J. Appl. Bacteriol.*, 66, 379-384.
- Jablonski, L., Bohach, G.A., 2001. *Staphylococcus aureus*. In: Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ. Food microbiology fundamentals and frontiers. America society of Microbiology Press, Washington DC, 411-434.
- Janin, F., De Buyser, M.L., Lapeyre, C., Feinberg, M., 1983. Radioimmunological quantitative determination of *Staphylococcus aureus* enterotoxin A in various food. *Sci. Aliments*, 3, 3, 397-412.
- Jarraud, S., Peyrat, M. A., Lim, A., Tristan, A., Bes, M., Mougel, C., Etienne, J., Vandenesch, F., Bonneville, M. Lina, G., 2001. egc, a highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*. *J. Immunol.*, 166,1, 669-677.
- Jarraud, S., Mougel, C., Thioulouse, J., Lina, G., Meugnier, H., Forey, F., Nesme, X., Etienne, J., Vandenesch, F., 2002. Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, agr groups (alleles), and human disease. *Infect. Immun.*, 70, 2, 631-641.
- Jarvis, A.W., Lawrence, R.C., Pritchard, G.G., 1975. Glucose repression of enterotoxins A, B and C and other extracellular proteins in staphylococci in batch and continuous culture. *J. Gen. Microbiol.*, 86, 75-87.
- Johansson, H.J., Pettersson, T.N., Berglof, J.H., 1990. Development of a chromatographic process for large-scale purification of staphylococcal enterotoxin B. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 49, 3, 233-241.
- Johnson, W.M., Tyler, S.D., Ewan, E.P., Ashton, F.E., Pollard, D.R., Rosee, K.R., 1991. Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 29, 426-430.
- Jones, C.L., Khan, S.A., 1986. Nucleotide sequence of enterotoxin B gene from *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.*, 166, 29-33.
- Jorgensen, H.J., Mathisen, T., Lovseth, A., Omoe, K., Qvale, K.S., Loncarevic, S., 2005. An outbreak of staphylococcal food poisoning caused by enterotoxin H in mashed potato made with raw milk. *FEMS Microbiol. Letters*, 252, 267-272.
- Jourdan-Da Silva, N., Vaillant, V., 2008. Surveillance des toxi-infections alimentaires collectives en France. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.* 23, 1, 7-14.
- Karakawa, W.W., Fournier, J.M., Vann, W.F., Arbeit, R., Schneerson, R.S., Robbins, J.B., 1985. Method for the serological typing of the capsular polysaccharides of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.*, 22, 3, 445-447.

- Kauffman, N.M., Roberts, R.F., 2006. Staphylococcal enterotoxin D production by *Staphylococcus aureus* FRI 100. *J. Food Prot.*, 69, 6, 1448-1451.
- Keller, G.M., Hanson, R.S., Bergdoll, M.S., 1978. Effect of minerals on staphylococcal enterotoxin B production. *Infect. Immun.*, 20, 158-160.
- Kerouanton, A., Hennekinne, J.A., Letertre, C., Petit, L., Chesneau, O., Brisabois, A., De Buyser, M.L., 2007. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. *Int. J. Food Microbiol.*, 115, 369-375.
- Khambaty, F.M., Bennett, R.W., Shah, D.B., 1994. Application of pulse field gel electrophoresis to the epidemiological characterization of *Staphylococcus intermedius* implicated in a food-related outbreak. *Epidemiol. Infect.*, 113, 75-81.
- Khreich, N., Lamourette, P., Boutal, H., Devilliers, K., Creminon, C., Volland, H., 2008. Detection of Staphylococcus enterotoxin B using fluorescent immunoliposomes as label for immunochromatographic testing. *Anal. Biochem.*, 377, 2, 182-188.
- Klotz, M., Opper, S., Heeg, K., Zimmermann, S., 2003. Detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxins A to D by real-time fluorescence PCR assay. *J. Clin. Microbiol.*, 41, 10, 4683-4687.
- Koch, R. 1878. Untersuchungen über die Aetiologie der Wundinfektionskrankheiten. *Ges. Werke.*, 1, 61-108.
- Kornblum, J.B., Kreiswirth, N., Projan, S.J., 1990. A polycistronic locus regulating exoprotein synthesis in *Staphylococcus aureus*. *Molecular biology of the staphylococci*. Eds R.P. Novick, 373-402.
- Kuramoto, S., Kodama, H., Yamada, K., Inui, I., Kitagawa, E., Kawakami, K., Satomi, R., Ikawa, A., Omoe, K., Shinagawa, K., 2006. Food poisoning attributable to *Staphylococcus aureus* deficient in all of the staphylococcal enterotoxin genes so far reported. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 59, 347.
- Kuroda, M., Ohta, T., Uchiyama, I., 2001. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*, 357, 1225-1240.
- Lachica, R.V., 1984. Egg yolk-free Baird-Parker medium for the accelerated enumeration of foodborne *Staphylococcus aureus*. *Appl. Env. Microbiol.*, 48, 870-871.
- Lam, M.T., Wan, Q.H., Boulet, C.A., Le, X.C., 1999. Competitive Immunoassay for staphylococcal enterotoxin A using capillary electrophoresis with laser induced fluorescence detection. *J. Chromatogr. A.*, 853, 1-2, 545-553.
- Lapeyre, C., Kaveri, S.V., Janin, F., Strosberg, A.D., 1987. Production and characterization of monoclonal antibodies to staphylococcal enterotoxins : use in immunodetection and immunopurification. *Mol. Immunol.*, 24, 12, 1243-1254.
- Lapeyre, C., Janin, F., Kaveri, S.V., 1988. Indirect double sandwich ELISA using monoclonal antibodies for detection of staphylococcal enterotoxins A, B, C₁ and D in food samples. *Food Microbiol.*, 5, 25-31.

- Lapeyre, C., Maire, T., Messio, S., Dragacci, S., 2001. Enzyme immunoassay of staphylococcal enterotoxins in dairy products with cleanup and concentration by immunoaffinity column. *J. AOAC Int.*, 84, 1587-1592.
- Lawrynowicz-Paciorek, M., Kochman, M., Piekarska, K., Grochowska, A., Windyga, B., 2007. The distribution of enterotoxin and enterotoxin-like genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from nasal carriers and food samples. *Int. J. Food Microbiol.*, 117, 3, 319-323.
- Lebaron, P., Baleux, B., 1988. Utilisation d'un nouveau milieu de culture sélectif pour l'isolement de *Staphylococcus aureus* dans différents types d'eau. *C. R. Acad. Sci.*, 306, III, 317-320.
- Lee, Y.D., Moon, B.Y., Park, J.H., Chang, H.I., Kim, W.J., 2007. Expression of enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates based on mRNA analysis. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 17, 3, 461-467.
- Lei, Z., Reiser, R.F., Bergdoll, M.S. 1988. Chromatofocusing in the purification of staphylococcal enterotoxin D. *J. Clin. Microbiol.*, 26, 6, 1236-1237.
- Letertre, C., Perelle, S., Dilasser, F., Fach, F., 2003a. A strategy based on 5' nuclease multiplex PCR to detect enterotoxin genes *sea* to *sej* of *Staphylococcus aureus*. *Mol. Cell. Probes.*, 17, 227-235.
- Letertre, C., Perelle, S., Dilasser, F., Fach, P., 2003b. Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by the *egc* cluster of *Staphylococcus aureus*. *J. Appl. Microbiol.*, 95, 1, 38-43.
- Lina, G., Bohach, G. A., Nair, S. P., Hiramatsu, K., Jouvin-Marche, E., Mariuzza, R., 2004. Standard nomenclature for the superantigens expressed by *Staphylococcus*. *J. Infect. Dis.*, 189, 12, 2334-2336.
- Loncarevic, S., Jorgensen, H.J., Lovseth, A., Mathisen, T., Rorvik, L.M., 2005. Diversity of *Staphylococcus aureus* enterotoxin types within single samples of raw milk and raw milk products. *J. Appl. Microbiol.*, 98, 2, 344-350.
- Macaluso, L., Lapeyre, C., Dragacci, S., 1998. Determination of influential factors during sample preparation for staphylococcal enterotoxin detection in dairy products. *Analisis*, 26, 300-304.
- Macaluso, L., Lapeyre, C., 2000. Characterisation of the staphylococcal enterotoxin research method in a dairy product. *Analisis*, 28, 610-615.
- Mac Cormick, J.K., Yarwood, J.M., Schlievert, P.M., 2001. Toxic shock syndrome and bacterial superantigens: an update. *Annu. Rev. Microbiol.*, 55, 77-104.
- Mac Lauchlin, J., Narayanan, G.L., Mithani, V., O'Neill, G., 2000. The detection of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin genes in *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. *J. Food Prot.*, 63, 479-488.
- Martin, S.E., Myers, E.R., Iandolo, J.J., 2001. *Staphylococcus aureus* In : Hui Y. H., Pierson M. D., Gorham J. R. (eds) *Foodborne disease handbook Vol. 1 – Bacterial pathogens*. New York Basel : Marcel Dekker Inc., 345-381.
- Marr, J.C., Lyon, J.D., Roberson, J.R., 1993. Characterization of novel type C staphylococcal enterotoxins : biological and evolutionary implications. *Infect. Immun.*, 61, 4254-4262.

- Mead, P.S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L.F., Bresee, J.S., Shapiro, C., Griffin, P.M., Tauxe, R.V. 1999. Food-related illness and death in the United States. *Emerg. Infect. Dis.*, 5, 607-625.
- Meyer, R.F., Palmieri, M.J., 1980. Single radial immunodiffusion method for screening Staphylococcal isolates for enterotoxin. *Appl. Environ. Microbiol.*, 40, 6, 1080-1085.
- Meyrand, A., Atrache, V., Bavai, C., Montet, M.P., Vernozy-Rozand, C., 1999. Evaluation of an alternative extraction procedure for enterotoxin determination in dairy products. *Lett. Appl. Microbiol.*, 28, 411-415.
- Michino, H., Otsuki, K., 2000. Risk factors in causing outbreaks of foodborne illness originating in school lunch facilities in Japan. *J. Vet. Med. Sci.*, 62, 557-560.
- Miller, B.A., Reiser, R.F., Bergdoll, M.S., 1978. Detection of staphylococcal enterotoxins A, B, C, D, and E in foods by radioimmunoassay, using staphylococcal cells containing protein A as immunoadsorbent. *Appl. Environ. Microbiol.*, 36, 3, 421-426.
- Minor, T.E., Marth, E.H., 1971. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal food intoxications. A review. I. The staphylococci: characterisation, isolation, and behaviour in artificial media. *J. Milk. Food Technol.*, 34, 557-564.
- Mintzer-Morgenstern, L., Katzenelson, E., 1982. A simple medium for isolation of coagulase-positive staphylococci in a single step. *J. Food Prot.*, 45, 3, 218-222.
- Morita, T.N., Patterson, J.E., Woodburn, M.J., 1979. Magnesium and iron addition to casein hydrolysate medium for production of staphylococcal enterotoxins A, B, and C. *Appl. Environ. Microbiol.*, 38, 39-42.
- Morse, S.A., Mah, R.A., Dobrogosz, W.J., 1969. Regulation of staphylococcal enterotoxin B. *J. Bacteriol.*, 98, 4-9.
- Mossel, D.A., Corry, J.E.L., Struijk, C.B., Baird, R.M., 1995. *Essentials of the microbiology of foods. A textbook for advanced studies.* John Wiley and Sons, Chichester, England, 146-150.
- Munson, S.H., Tremaine, M.T., Betley, M.J., 1998. Identification and characterization of staphylococcal enterotoxins types G and I from *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.*, 66, 3337-3348.
- Nakano, M., Kawano, Y., Kawagishi, M., Hasegawa, T., Inuma, Y., Ohta, M., 2002. Two-dimensional analysis of exoproteins of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) for possible epidemiological applications. *Microbiol. Immunol.*, 46, 11-22.
- Nedelkov, D., Nelson, R.W., 2003. Detection of Staphylococcal enterotoxin B via biomolecular interaction analysis mass spectrometry. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 9, 5212-5215.
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S., von Heijne, G., 1997. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Engineering*, 10, 1-6.
- Noto, M.J., Archer, G.L., 2006. A subset of *Staphylococcus aureus* strains harboring staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) type IV is deficient in CcrAB-mediated SCCmec excision. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 8, 2782-2788.

- Novick, R. P., Schlievert, P., Ruzin, A., 2001. Pathogenicity and resistance islands of staphylococci. *Microbes Infect.*, 3, 7, 585-594.
- Ogston, A. 1880. Über Abscesse. *Arch. Klin. Chir.*, 25, 588-600.
- Omoe, K., Ishikawa, M., Shimoda, Y., Hu, D.L., Ueda, S., Shinagawa, K., 2002. Detection of *seg*, *seh*, and *sei* genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of the enterotoxin productivities of *S. aureus* isolates harboring *seg*, *seh*, or *sei* genes. *J. Clin. Microbiol.*, 40, 857-862.
- Omoe, K., Hu, D. L., Takahashi-Omoe, H., Nakane, A., Shinagawa, K., 2003. Identification and characterization of a new staphylococcal enterotoxin-related putative toxin encoded by two kinds of plasmids. *Infect. Immun.*, 71, 10, 6088-6094.
- Omoe, K., Imanishi, K., Hu, D.L., 2004. Biological properties of staphylococcal enterotoxin-like type R. *Infect. Immun.*, 72, 3664-3667.
- Omoe, K., Imanishi, K., Hu, D. L., Kato, H., Fugane, Y., Abe, Y., Hamaoka, S., Watanabe, Y., Nakane, A., Uchiyama, T., Shinagawa, K., 2005. Characterization of novel staphylococcal enterotoxin-like toxin type P. *Infect. Immun.* 73, 9, 5540-5546.
- Ong, S.E., Foster, L.J., Mann, M., 2003. Mass spectrometry-based approaches in quantitative proteomics. *Methods*, 29, 124-130.
- Ono, H. K., Omoe, K., Imanishi, K., Iwakabe, Y., Hu, D. L., Kato, H., Saito, N., Nakane, A., Uchiyama, T., Shinagawa, K., 2008. Identification and characterization of two novel staphylococcal enterotoxins types S and T. *Infect. Immun.*, 76, 11, 4999-5005.
- Orwin, P. M., Leung, D. Y., Donahue, H. L., Novick, R. P., Schlievert, P. M., 2001. Biochemical and Biological Properties of Staphylococcal Enterotoxin K. *Infect. Immun.*, 69, 1, 360-366.
- Pantucek, R., Sedlacek, I., Petras, P., Koukalova, D., Svec, P., Stetina, V., Vancanneyt, M., Chrastinova, L., Vokurkova, J., Ruzickova, V., Doskar, J., Swings, J., Hajek, V., 2005. *Staphylococcus simiae* sp. nov., isolated from South American squirrel monkeys. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 55, Pt 5, 1953-1958.
- Park, C.E., Akhtar, M., Rayman, M.K., 1992. Nonspecific reactions of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay kit (TECRA) for detection of staphylococcal enterotoxins in foods. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 8, 2509-2512.
- Pasteur, L. 1880. De l'extension de la théorie des germes à l'étiologie de quelques maladies communes. *C.R. Séances Soc. Biol. Paris*, 90, 1035-44.
- Pereira, M.L., Do Carmo, L., Dos Santos, E.J., Pereira, J.L., Bergdoll, M.S., 1996. Enterotoxin H in staphylococcal food poisoning. *J. Food Prot.*, 59, 559-561.
- Perry, J.D., Rennison, C., Butterworth, L.A., Hopley, A.L., Gould, F.K., 2003. Evaluation of *S. aureus* ID, a new chromogenic agar medium for detection of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.*, 41, 12, 5695-5698.

- Pocsfalvi, G., Cacace, G., Cuccurullo, M., Serluca, G., Sorrentino, A., Schlosser, G., Blaiotta, G., Malorni, A., 2008. Proteomic analysis of exotoxins expressed by enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains. *Proteomics*, 8, 2462-2476.
- Poli, A., Guglielmini, E., Sembeni, S., Spiazzi, M., Dellaglio, F., Rossi, F., Torriani, S., 2007. Detection of *Staphylococcus aureus* and enterotoxin genotype diversity in Monte Veronese, a Protected Designation of Origin Italian cheese. *Lett. Appl. Microbiol.*, 45, 5, 529-534.
- Pratt, J.M., Simpson, D.M., Doherty, M.K., Rivers, J., Gaskell, S.J., Beynon, R.J., 2006. Multiplexed absolute quantification for proteomics using concatenated signature peptides encoded by QconCAT genes. *Nat. Protoc.*, 1, 1029-1043.
- Prévost, G., Jaulhac, B., Piemont, Y., 1992. DNA fingerprinting by pulsed-field gel electrophoresis is more effective than ribotyping in distinguishing among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *J. Clin. Microbiol.*, 30, 4, 967-973.
- Qi, Y., Miller, K.J., 2000. Effect of low water activity on staphylococcal enterotoxin A and B biosynthesis. *J. Food Prot.*, 63, 473-478.
- Rajkovic, A., Moualij, B.E., Uyttendaele, M., Brolet, P., Zorzi, W., Heinen, E., Foubert, E., Debevere, J., 2006. Immunoquantitative Real-Time PCR for detection and quantification of *Staphylococcus aureus* enterotoxin B in foods. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72, 10, 6593-6599.
- Ren, K., Bannan, J. D., Pancholi, V., Cheung, A. L., Robbins, J. C., Fischetti, V. A., Zabriskie, J. B., 1994. Characterization and biological properties of a new staphylococcal exotoxin. *J. Exp. Med.*, 180, 5, 1675-1683.
- Reynolds, D., Tranter, H.S., Sage, R., Hambleton, P., 1988. Novel method for purification of staphylococcal enterotoxin A. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 7, 1761-1765.
- Rivers, J., Simpson, D.M., Robertson, D.H., Gaskell, S.J., Beynon, R.J., 2007. Absolute multiplexed quantitative analysis of protein expression during muscle expression using QconCAT. *Mol. Cell. Proteomics*, 6, 8, 1416-1427.
- Robbins, R., Gould, S., Bergdoll, M.S., 1974. Detecting the enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* strains. *Appl. Microbiol.*, 28, 6, 946-950.
- Rosec, J.P., Guiraud, J.P., Dalet, C., Richard, N., 1997. Enterotoxin production by staphylococci isolated from foods in France. *Int. J. Food Microbiol.*, 35, 213-221.
- Rosec, J.P., Gigaud, O., 2002. Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France. *Int. J. Food Microbiol.*, 77, 61-70.
- Rosenbach, F.J., 1884. *Microorganismen bei den Wund-Infektions-Krankheiten des Menschen*. Bergmann, J.F. Wiesbaden, 1-122.
- Ruzickova, V., Karpiskova, R., Pantucek, R., Pospisilova, M., Cernikova, P., Doskar, J., 2008. Genotype analysis of enterotoxin H-positive *Staphylococcus aureus* strains isolated from food samples in the Czech Republic. *Int. J. Food Microbiol.*, 121, 1, 60-65.

Schlichting, C., Branger, C., Fournier, J. M., Witte, W., Boutonnier, A., Wolz, C., Goulet, P., Doring, G. 1993. Typing of *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis, zymotyping, capsular typing, and phage typing: resolution of clonal relationships. J Clin Microbiol., 31, 2, 227-232.

Schmidt, J.J., Spero, L., 1983. The complete amino acid sequence of staphylococcal enterotoxin C1. J. Biol. Chem., 258, 10, 6300-6306.

Schmitt, M., Schuler-Schmid, U., Schmidt-Lorenz, W., 1990. Temperature limits of growth, TNase and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. Int. J. Food Microbiol., 11, 1-19.

Schotte, U., Langfeldt, N., Peruski, A.H., Meyer, H., 2002. Detection of staphylococcal enterotoxin B (SEB) by enzyme-linked immunosorbent assay and by a rapid hand-held assay. Clin. Lab., 48, 7-8, 395-400.

Schlosser, G., Kacer, P., Kuzma, M., Szilagyi, Z., Sorrentino, A., Manzo, C., Pizzano, R., Malorni, L., Pocsfalvi, G., 2007. Coupling immunomagnetic separation on magnetic beads with matrix-laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for detection of staphylococcal enterotoxin B. Appl. Environ. Microbiol., 73, 6945-6952.

Schwabe, M., Notermans, S., Boot, R., 1990. Inactivation of staphylococcal enterotoxins by heat and reactivation by high pH treatment. Int. J. Food. Microbiol., 10, 33-42.

Shafer, W.M., Iandolo, J.J., 1978. Chromosomal locus for staphylococcal enterotoxin B. Infect. Immun., 20, 1, 273-278.

Shalita, Z., Hertman, I., Sarid, S., 1977. Isolation and characterization of a plasmid involved with enterotoxin B production in *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol., 129, 317-325.

Shimizu, A., Fujita, M., Igarashi, H., Takagi, M., Nagase, N., Sasaki, A., Kawano, J., 2000. Characterization of *Staphylococcus aureus* coagulase type VII isolates from Staphylococcal Food Poisoning Outbreaks (1980-1995) in Tokyo, Japan, by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. J. Clin. Microbiol., 38, 3746-3749.

Shinagawa, K., Mitsumori, M., Matsusaka, N., Sugii, S., 1991. Purification of staphylococcal enterotoxins A and E by immunoaffinity chromatography using a murine monoclonal antibody with dual specificity for both of these toxins. J. Immun. Methods, 139, 49-53.

Sinell, H.G., Baumgart, J., 1967. Selectivnährböden mit eigelb zur isolierung von pathogenen staphylokokken aus lebensmitteln. Zbl. Bakt. I. Orig., 204, 248-264.

Smith, B.A., Baird-Parker, A.C., 1964. The use of sulphamezathine for inhibiting *Proteus spp* on Baird-Parker's isolation medium for *Staphylococcus aureus*. J. Appl. Bacteriol., 27, 78-82.

Smith, J.L., Buchanan, R.L., Palumbo, S.A., 1983. Effect of food environment on staphylococcal enterotoxin synthesis: a review. J. Food Prot., 46, 545-55.

Smyth, D.S., Kennedy, J., Twohig, J., Miajlovic, H., Bolton, D., Smyth, C.J., 2006. *Staphylococcus aureus* isolates from Irish domestic refrigerators possess novel enterotoxin and enterotoxin-like genes and are clonal in nature. J. Food Prot., 69, 3, 508-515.

- Soejima, T., Nagao, E., Kubota, T., Yamagata, H., Kagi, H., 2004. Comparison between ultrafiltration and trichloroacetic acid precipitation method for concentration of *Staphylococcus aureus* enterotoxin in dairy samples. *Int. J. Food Microbiol.*, 93, 2, 185-194.
- Steen, H, Mann, M., 2004. The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 5, 699-711.
- Stepan, J., Pantucek, R., Doskar, J., 2004. Molecular diagnostics of clinically important staphylococci. *Folia Microbio.*, 49, 4, 353-386.
- Strickler, M.P., Neill, R.J., Stone, M.J., Hunt, R.E., Brinkley, W., Gemski, P., 1989. Rapid purification of staphylococcal enterotoxin B by high-pressure liquid chromatography. *J. Clin. Microbiol.*, 27, 5, 1031-1035.
- Straub, J.A., Hertel, C., Hammes, W.P., 1999. A 23S rDNA-targeted polymerase chain reaction-based system for detection of *Staphylococcus aureus* in meat starter culture and dairy products. *J. Food Prot.* 62, 1150–1156.
- Su, Y.C., Wong, A.C., 1996. Detection of staphylococcal enterotoxin H by an enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Food Prot.*, 59, 3, 327-330.
- Sugiyama, H., Chow, K.L., Dragstedt, L.R., 2nd, 1961. Study of emetic receptor sites for staphylococcal enterotoxin in monkeys. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 108, 92-95.
- Sugiyama, H., Hayama, T., 1964. Comparative resistance of vagotomized monkeys to intravenous vs. intragastric staphylococcal enterotoxin challenges. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 115, 243-246.
- Sugiyama, H., Mac Kissic, E.M., 1966. Leukocytic response in monkeys challenged with staphylococcal enterotoxin. *J. Bacteriol.*, 92, 2, 349-352.
- Surgalla, M., Bergdoll, M.S., Dack, G.M., 1953. Some observations on the assay of staphylococcal enterotoxin by the monkey feeding test. *J. Lab. Clin. Med.*, 41, 782-788.
- Tamarapu, S., Mac Killip, J.L., Drake, M., 2001. Development of a multiplex polymerase chain reaction assay for detection and differentiation of *Staphylococcus aureus* in dairy products. *J. Food Prot.*, 64, 5, 664-668.
- Tatini, S.R., Wesala, W.D., Jezeski, J.J., Morris, H.A., 1973. Production of, staphylococcal enterotoxin A in Blue, Brick, Mozzarella, and Swiss cheeses. *J. Dairy Sci.*, 56, 4, 429-435.
- Thomas, D. Y., Jarraud, S., Lemercier, B., Cozon, G., Echasserieau, K., Etienne, J., Gougeon, M. L., Lina, G., Vandenesch, F., 2006. Staphylococcal enterotoxin-like toxins U2 and V, two new staphylococcal superantigens arising from recombination within the enterotoxin gene cluster. *Infect. Immun.*, 74, 8, 4724-4734.
- Thota, H., Tatini, S.R., Bennett, R.W., 1973. Effects of temperature, pH and NaCl on production of staphylococcal enterotoxins E and F. *Abstr. Ann. Meet. Am. Soc. Microbiol.*, E1, p. 1.

- Tomlinson, A.J., Naylor, S., 1995. Systematic development of on-line membrane preconcentration-capillary electrophoresis-mass spectrometry for the analysis of peptide mixtures. *J. Capillary Electrophor.*, 2, 5, 225-233.
- Tremaine, M. T., Brockman, D. K., Betley, M. J., 1993. Staphylococcal enterotoxin A gene (*sea*) expression is not affected by the accessory gene regulator (*agr*). *Infect. Immun.*, 61, 1, 356-359.
- Tsen, H.Y., Yu, G.K., Hu, H.H., 1997. Comparison of type A enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains isolated from geographically far distant locations by pulsed field gel electrophoresis. *J. Appl. Microbiol.*, 82, 4, 485-493.
- Van Netten, P., Van Der Ven, J., Jaisli, F., Mossel, D.A., 1990. The enumeration of sublethally injured populations of *Staphylococcus aureus* in foods. *Lett. Appl. Microbiol.*, 10, 117-122.
- Vanderlinde, P.B., Fegan, N., Mills, L., Desmarchelier, P.M., 1999. Use of pulse field gel electrophoresis for the epidemiological characterisation of coagulase positive *Staphylococcus* isolated from meat workers and beef carcasses. *Int J Food Microbiol.*, 48, 2, 81-85.
- Veras, J. F., do Carmo, L. S., Tong, L. C., Shupp, J. W., Cummings, C., Dos Santos, D. A., Cerqueira, M. M., Cantini, A., Nicoli, J. R., Jett, M., 2008. A study of the enterotoxigenicity of coagulase-negative and coagulase-positive staphylococcal isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerais, Brazil. *Int. J. Infect. Dis.*, 12, 4, 410-415.
- Vojtov, N., Ross, H.F., Novick, R.P., 2002. Global repression of exotoxin synthesis by staphylococcal superantigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 15, 10102-10107.
- Wang, S.J., Chow, L.W., Wu, M.J., 2002. Multiplex PCR for the simultaneous detection of the SEA, SEB, SEC, SED and SEE genes of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus*. *J. Food Drug. Anal.*, 10, 164-169.
- Wei, H., Nolkranz, K., Parkin, M.C., Chisolm, C.N., O'Callaghan, J.P., Kennedy, R.T., 2006. Identification and quantification of neuropeptides in brain tissue by capillary liquid chromatography coupled off-line to MALDI-TOF and MALDI-TOF/TOF-MF. *Anal. Chem.*, 78, 4342-4351.
- Williams, R.R., Wehr, C.T., Roger, T.J., Bennett, R.W., 1983. High-performance liquid chromatography of staphylococcal enterotoxin B. *J. Chromatogr. A.*, 26, 266, 179-186.
- Wilson, I.G., Cooper, J.E., Gilmour, A. 1991. Detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in dried skimmed milk: use of the polymerase chain reaction for amplification and detection of staphylococcal enterotoxin genes *entB* and *entC1* and the thermonuclease gene *nuc*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 6, 1793-1798.
- Woodburn, M.J., Morita, T.N., Rowe, K., Park, S.S., 1978. Staphylococcal enterotoxin A and C production with various sugars as energy source. *J. Food Prot.*, 41, 643-6.
- Wright, A., Andrews, P.L., Titball, R.W., 2000. Induction of emetic, pyrexia, and behavioral effects of *Staphylococcus aureus* enterotoxin B in the ferret. *Infect. Immun.*, 68, 4, 2386-2389.

- Wright, J.D., Holland, K.T., 2003. The effect of cell density and specific growth rate on accessory gene regulator and toxic shock syndrome toxin-1 gene expression in *Staphylococcus aureus*. FEMS Microbiol. Letters, 218, 2, 377-383.
- Wu, Z.L., Zhang, Z.C., Li, C.W., Li, S.S., Xi, Z.Y. Zhou, Y.N. Yin, C.R., 1992. Study of the non specific reaction problems in the procedure using TECRA kit for detection of staphylococcal enterotoxins. J. Assoc. Rapid Method Automation. Microbiol., 4, 105-109.
- Yasuo, S., Mieko, K.K., 2005. Mass spectrometric strategy for the determination of natural and synthetic organic toxins. J. Health Sci., 51, 5, 519-525.
- Zehren, V., Zeheren, V., 1968. Relation of acid development during cheesemaking to development of staphylococcal enterotoxin A. J. Dairy Sci., 51, 645-649.
- Zecconi, A., Cesaris, L., Liandris, E., Dapra, V., Piccinini, R., 2006. Role of several *Staphylococcus aureus* virulence factors on the inflammatory response in bovine mammary gland. Microb. Pathog., 40 , 4, 177-183.
- Zell, C., Resch, M., Rosenstein, R., Albrecht, T., Hertel, C., Gotz, F., 2008. Characterization of toxin production of coagulase-negative staphylococci isolated from food and starter cultures. Int. J. Food Microbiol., 127, 3, 246-251.
- Zhang, S., landolo, J.J., Stewart, G.C., 1998. The enterotoxin D plasmid of *Staphylococcus aureus* encodes a second enterotoxin determinant (*sej*). FEMS Microbiol. Letters, 168, 227-233.

Annexe 1 : Assurance Qualité des travaux de thèse

La majeure partie des travaux de cette thèse a été réalisée dans l'Unité Caractérisation des toxines de l'AFSSA-LERQAP, accréditée « essais » par le Comité Français d'Accréditation (Cofrac) selon la norme NF EN ISO 17025 « exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais » (dossier 1-0245, portée disponible sur le site www.cofrac.fr).

Les essais du domaine de la portée (Entérotoxines de staphylocoques) ont été réalisés en application du système de management de la qualité « essais ».

L'AFSSA-LERQAP s'est de plus dotée d'un système de management de la qualité en recherche, construit sur les principes de la norme NF EN ISO 17025 et complété par des dispositions spécifiques à la recherche et à la gestion de projet.

Les travaux du doctorant ont été audités sur l'application de ces deux systèmes par l'équipe qualité de l'AFSSA-LERQAP.

La mise au point de la méthodologie et les analyses par spectrométrie de masse ont fait l'objet d'une collaboration avec la plate-forme d'analyses protéomiques du laboratoire d'Étude de la Dynamique des Protéomes (LEDyP) du Commissariat à l'Énergie Atomique de Grenoble actuellement en démarche qualité (traçabilité des échantillons et des analyses) avec objectif de certification en 2009.

Annexe 2: Electrophorèse bi-dimensionnelle couplée à la spectrométrie de masse

1. Première dimension : Isoélectrofocalisation (IEF)

L'électrofocalisation (IEF) est une méthode qui sépare les protéines suivant leur point isoélectrique, pI . Les protéines sont des molécules amphothères, elles peuvent être chargées positivement, négativement ou ne pas avoir de charge selon le pH de la solution dans laquelle elles se trouvent. La charge nette d'une protéine est la somme des charges négatives et positives de ses extrémités et des chaînes latérales des acides aminés qui la composent. Le point isoélectrique correspond au pH où la charge nette de la protéine est égale à 0. Les protéines sont chargées positivement à pH inférieur à leur pI et négativement à pH supérieur.

En solution, les protéines sont chargées. Lorsqu'on les soumet à un gradient de pH, sous l'influence d'un champ électrique :

- les protéines chargées positivement migrent, à travers le gradient de pH, vers la cathode en perdant, au fur et à mesure, leurs charges positives pour arriver à une charge nette nulle lorsqu'elles atteignent leur pI .
- les protéines chargées négativement migrent, à travers le gradient de pH, vers l'anode en perdant, au fur et à mesure, leurs charges négatives pour arriver à une charge nette nulle lorsqu'elles atteignent leur pI .

Si elles diffusaient au delà de ce point isoélectrique, elles seraient à nouveau chargées et elles reviendraient à cette valeur.

La préparation des échantillons est l'étape critique de l'électrophorèse 2D. Afin d'assurer une séparation optimales, les protéines doivent être dénaturées et complètement solubilisées dans le tampon qui servira à l'électrofocalisation contenant de :

- l'urée pour solubiliser et déplier la plupart des protéines et rendre tous les groupes ionisables accessibles,
- du CHAPS, du Triton X100, ou un autre détergent non-ionique ou zwitterionique pour assurer une complète solubilisation et prévenir de l'agrégation due à des interactions hydrophobes,

- du DTT (dithiothréitol) ou du β mercaptoéthanol, agent réducteur qui rompt les ponts disulfures et maintient les protéines dans un état réduit,
- des ampholytes ou de l'IPG Buffer correspondant aux pH désirés pour définir le gradient de pH lorsqu'on appliquera le courant et pour augmenter la solubilité des protéines en minimisant leur agrégation due aux charges électrostatiques mises en présence.

L'extraction des protéines a été réalisée soit par utilisation du kit 2-D Clean-Up (GE Healthcare) soit par précipitation à l'acide trichloracétique (TCA) : Pour chaque volume de 1 mL de chaque surnageant à traiter, 100 μ L d'une solution de TCA à 90 % ont été rajoutés. Après homogénéisation et incubation 30 minutes dans la glace, les protéines précipitées ont été centrifugées 30 minutes à 3220 g à 4°C. L'intégralité du surnageant a été éliminé et le culot protéique a été re-solubilisé dans 100 μ L de solution de réhydratation pour IEF.

Quelle que soit la méthodologie utilisée les protéines présentes dans l'extrait ont été quantifiées en utilisant le kit 2-D quant (GE Healthcare) : Les solutions du kit 2-D quant (GE Healthcare) utilisant une gamme de sérum albumine bovine ont été utilisées pour doser les extraits suivants les recommandations du fournisseur. Les absorbances de chaque échantillon et des solutions standard ont été mesurées à 480 nm en utilisant un spectrophotomètre (Jenway). La procédure décrite dans le kit 2D clean up (GE Healthcare) a été mise en œuvre pour des volumes d'échantillons (surnageants de culture) de 100 μ L (contenant 100 μ g de protéine par échantillon mesurés par le kit 2D quant). Les culots protéiques ont été repris dans un volume de 100 μ L de solution de réhydratation pour IEF.

Les bandes de gammes de pH (strips GE Healthcare) ont été réhydratées dans un tampon contenant des ampholytes sans ajout de l'échantillon comme recommandé par le fournisseur (Tableau 1)

La solution de Réhydratation Destreak contient des concentrations optimisées d'urée, thiourée et de CHAPS. Le tampon IPG doit être ajouté avant utilisation. Ainsi, 15 μ L (0,5%) de tampon IPG ont été rajoutés dans 3 mL de solution de réhydratation Destreak puis 340 μ L de solution de réhydratation Destreak ont été utilisés. Chaque strip a été réhydratée entre 10 et 16 heures à température ambiante.

Tableau 1 : Strips et tampons IPG associés utilisés pour la 2D PAGE-MS

Immobiline DryStrip	IPG Buffer
pH 3-10 NL	3-10 NL
pH 6-9 ; 6 ; 6-11 ; 6,2-7,5	6-11

L'iso électrofocalisation a été réalisée dans le système Ettan IPGphor II (GE Healthcare) sous les conditions présentées dans le tableau 2.

Tableau 2 : Programme de migration utilisé avec des strips 3-10 NL et 6-9, 18 cm. Température 20° C

Etape	Voltage (V)	Temps (h:min)
1 step and hold	500	1:00
2 gradient	1000	1:00
3 gradient	8 000	3:00
4 step and hold	8 000	3:00

Après migration des protéines, les strips ont été conservées à -80°C pour figer les protéines avant l'électrophorèse de deuxième dimension.

2. Seconde dimension : Electrophorèse SDS PAGE

Lors d'une électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de sodium dodecylsulfate, SDS, (SDS-PAGE), la migration n'est pas déterminée par les charges électriques des protéines mais par leur masse moléculaire. Le SDS est un agent anionique qui se fixe sur les protéines, masquant la charge propre des protéines, en formant un complexe anionique ayant une charge nette négative. Le SDS rompt les ponts hydrogènes, bloque les interactions hydrophobes, et déplie partiellement les protéines. Les protéines sont totalement dépliées et réduites par addition de dithiothréitol (DTT) et alkylées par addition d'iodoacétamide. Le gel de polyacrylamide sert de tamis moléculaire. La séparation des protéines se fera exclusivement en fonction de leur masse moléculaire. La distance de migration du polypeptide-SDS est proportionnelle au logarithme de sa masse moléculaire et varie en fonction de la concentration en polyacrylamide du gel.

L'électrophorèse de deuxième dimension a été réalisée à l'aide du système Ettan Dalt six Electrophoresis (GE Healthcare) couplé au générateur de courant EPS 601 (GE Healthcare). La régulation de température de la cuve d'électrophorèse a été assurée par le système MultiTemp III (GE Healthcare) en ajustant la température à 14°C , température recommandée pour effectuer les électrophorèses.

Avant de réaliser la seconde dimension les strips ont être équilibrées dans des tampons d'équilibration contenant du SDS (Tableau 3) auxquels ont été rajoutés extemporanément du DTT (réduction des ponts disulfures) et de l'iodoacétamide (alkylation des chaînes latérales des acides aminés).

Tableau 3 : composition du tampon d'équilibration utilisé avant la seconde dimension

	Concentration finale	Quantité
Urée (PM 60,06)	6 M	72,1 g
Tris-HCl, pH 8,8	75 mM	10,0 mL
Glycérol (87% M/M)	29,3% (v/v)	69 mL (84,2g)
SDS (PM 288,38)	2% (w/v)	4,0 g
1% bleu de bromophénol	0,002% (w/v)	400 µL
Eau osmosée	-	qsp 200 mL

Extemporément, ajouter

-aliquot 1 : ajouter du DTT (100 mg pour 10 mL) pour la première équilibration

-aliquot 2 : ajouter de l'iodoacétamide (250 mg pour 10 mL) pour la seconde équilibration

L'équilibration a été réalisée en deux temps sous agitation deux fois 15 minutes.

Afin de s'assurer de la reproductibilité des expérimentations des gels précoulés (Ettan Dalt 12,5 %, GE Healthcare) ont été utilisés.

De part et d'autre de la strip, des plugs d'agarose contenant des 200-1000 ng de marqueurs de masse moléculaire (basses et hautes masses moléculaires, GE Healthcare) ont été déposés.

La strip, les plugs et le gel ont été scellés à l'aide du tampon Laemmli SDS 1X (Tableau 4) contenant 0,5% d'agarose et 0,02% de bleu de bromophénol (Tableau 5).

Tableau 4 : composition du tampon d'électrophorèse Laemmli SDS 1X (25 mM Tris base, 192 mM tampon glycine, 0,1 % SDS, 10 L) utilisé pour la seconde dimension

	Concentration finale	Quantité
Tris base (PM 121,1)	25 mM	30,3 g
Glycine (PM 75,01)	192 mM	144,0 g
SDS (PM 288,38)	0,1 % (w/v)	10,0 g
Eau osmosée		qsp 10 L

Tableau 5 : composition de la solution utilisée pour assurer l'étanchéité du dispositif d'électrophorèse de seconde dimension

	Concentration finale	Quantité
Tampon d'électrophorèse Laemmli SDS		100 mL
Agarose (NA ou M)	0,5 %	0,5 g
1% solution stock de bleu de bromophénol	0,002 % (w/v)	22 µL

La composition du tampon d'électrophorèse 10X est présentée Tableau 6. Les tampons anode et cathode ont été utilisés à une concentration de 1X et 2X respectivement.

Tableau 6 : composition du tampon d'électrophorèse de seconde dimension

	Concentration finale	Quantité
Tris	250 mM	30,25 g
Glycine	1,92 M	144,1 g
SDS	1 % (w/v)	10 g
dd H ₂ O		qsp 1 L

Pour les gels utilisés (1 mm d'épaisseur), à une température de 14 °C, les conditions ont été les suivantes (Tableau 7)

Tableau 7 : paramètres utilisés pour l'électrophorèse de deuxième dimension

Etape	Puissance (Watt/gel)	Durée de l'électrophorèse (h : min)
1	2	0 : 45
2	17	4 : 00

Après électrophorèse, les gels ont été fixés dans une solution de fixation contenant de l'acide acétique, du méthanol et de l'eau osmosée (1:4:5) pendant 30 minutes puis colorés au bleu de Coomassie prêt à l'emploi (Biorad) pendant 1 heure. La décoloration a été effectuée pendant une nuit.

3. Découpage des spots protéiques

Chaque spot protéique d'intérêt se trouvant dans la zone de masse moléculaire attendue (20 à 30 KDa) a été découpé puis stocké dans des microtubes à faible adsorption protéique contenant de l'éthanol 10%. Les tubes ont été envoyés au Laboratoire "Etude de la Dynamique des Protéomes" du Commissariat à l'énergie atomique de Grenoble pour être analysés en spectrométrie de masse.

4. Digestion trypsique

Chaque spot protéique a été soumis à une digestion trypsique par 0,15 µg de Trypsine porcine modifiée (Proméga) durant une nuit à 37 °C. Afin de libérer les peptides trypsiques des mailles du gel de polyacrylamide, deux cycles en solution bicarbonate 25 mM / acétonitrile (1 :1) ont été réalisés pour récupérer les peptides. Après chaque lavage, un séchage sous vide a été réalisé. Les peptides ont été re-solubilisés dans une solution contenant 5% d'acétonitrile, 0,2 % d'acide formique.

5. Analyse par spectrométrie de masse

L'analyse a consisté en un couplage entre une chromatographie liquide nanodébit (U3000, Dionex) et un spectromètre de masse en tandem (Orbitrap, Thermo). Les spectres SM/SM issus de la fragmentation des peptides ont été comparés aux banques de données protéiques à l'aide du logiciel MassLynx (Waters). Ainsi un score correspondant à une probabilité de présence a été attribué à chacune des protéines présentes dans l'échantillon testé.

Annexe 3 : Identification des protéines par spectrométrie de masse

Souche	Génotype (sea à seu)	Numéro d'accession (Swiss-Prot Trembl)	Description
339 E	<i>seb, seg, sei, sem, sen, seu</i>	Q6R2G1_STAAU	Enterotoxin B - Staphylococcus aureus subsp. aureus
		TPIS_STAAB	Triosephosphate isomerase - Staphylococcus aureus (strain bovine RF122)
		Q2FGH8_STAA3	Putative uncharacterized protein - Staphylococcus aureus (strain USA300)
		Q2YWM8_STAAB	Leukocidin chain lukM
		Q2YWM7_STAAB	Panton-Valentine leukocidin LukF-PV chain
		Q6DF05_XENTR	MGC89234 protein
		GPMA_STAAB	2,3-bisphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase - Staphylococcus aureus (strain bovine RF122)
359 F	<i>sea</i>	A0EX09_9CAUD	Enterotoxin type A - Staphylococcus phage phiNM3
		ATL_STAAM	Bifunctional autolysin precursor [Includes: N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase - Staphylococcus aureus (strain Mu50 / ATCC 700699)]
		LIP1_STAAC	Lipase 1 precursor - Staphylococcus aureus (strain COL)
		ODP2_STAAC	Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex - Staphylococcus aureus (strain COL)
FRI 1230	<i>sec, sek, sel, sep, seq</i>	ODP2_STAAC	Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex - Staphylococcus aureus (strain COL)
		ENTC2_STAAU	Enterotoxin type C precursor - Staphylococcus aureus
428 G	<i>sec, sel</i>	A0FIN2_STAAU	Toxic shock syndrome toxic-1 - Staphylococcus aureus
		ATL_STAAM	Bifunctional autolysin precursor [Includes: N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase - Staphylococcus aureus (strain Mu50 / ATCC 700699)]
		ENTC2_STAAU	Enterotoxin type C precursor - Staphylococcus aureus
		ODP2_STAAC	Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex - Staphylococcus aureus (strain COL)
		PHLC_STAAC	Phospholipase C precursor
		HLA_STAAU	Alpha-hemolysin precursor
		Q2YWM8_STAAB	Leukocidin chain lukM
		Q2YWM7_STAAB	Panton-Valentine leukocidin LukF-PV chain
FRI 137	<i>sec, seg, seh, sei, sel, sem, sen, seu, seu</i>	ENTC1_STAAU	Enterotoxin type C precursor - Staphylococcus aureus
		A4FXT2_METM5	ATP/GTP-binding site motif A - Methanococcus maripaludis (strain C5 / ATCC BAA-1333)
		Q2FEJ0_STAA3	Secretory antigen SsaA - Staphylococcus aureus (strain USA300)
		SODM1_STAA3	Superoxide dismutase [Mn/Fe] 1 - Staphylococcus aureus (strain USA300)
		DNAK_STAAB	Chaperone protein dnaK - Staphylococcus aureus (strain bovine RF122)
		RRF_STAAB	Ribosome recycling factor - Staphylococcus aureus (strain bovine RF122)
		AHPF_STAAM	Alkyl hydroperoxide reductase subunit F - Staphylococcus aureus (strain Mu50 / ATCC 700699)
		Q2FFW0_STAA3	Transaldolase - Staphylococcus aureus (strain USA300)
		Q49YL0_STAS1	Putative transaldolase - Staphylococcus saprophyticus subsp. saprophyticus (strain ATCC 15305 / DSM 20229)
		DNAK_STAAB	Chaperone protein dnaK - Staphylococcus aureus (strain bovine RF122)
		HPS_STAAB	3-hexulose-6-phosphate synthase - Staphylococcus aureus (strain bovine RF122)
		ENO_LACLM	Enolase - Lactococcus lactis subsp. cremoris (strain MG1363)

Souche	Génotype (sea à seu)	Numéro d'accension (Swiss-Prot Trembl)	Description
383 F	<i>sec, seg, seh, sei, sel, sem, sen, seo, seu</i>	CLPP_STAAB	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit - <i>Staphylococcus aureus</i> (strain bovine RF122)
		SODM_STAXY	Superoxide dismutase [Mn/Fe] - <i>Staphylococcus xylosus</i>
		AHPC_STAAB	Alkyl hydroperoxide reductase subunit C - <i>Staphylococcus aureus</i> (strain bovine RF122)
		DEOC1_STAAB	Deoxyribose-phosphate aldolase 1 - <i>Staphylococcus aureus</i> (strain bovine RF122)
		Q6VAM8_STAAU	Enterotoxin H precursor - <i>Staphylococcus aureus</i>
		ALF1_STAA1	Fructose-bisphosphate aldolase class 1 - <i>Staphylococcus aureus</i> (strain Mu3 / ATCC 700698)
374 F	<i>seb, seo, sem, sei, sen, seg</i>	Q8GAX6_STAAU	Epidermal cell differentiation inhibitor B - <i>Staphylococcus aureus</i>
		Q2FFT0_STAA3	Serine protease SplB - <i>Staphylococcus aureus</i> (strain USA300)
		ATL_STAAM	Bifunctional autolysin precursor [Includes: N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase - <i>Staphylococcus aureus</i> (strain Mu50 / ATCC 700699)
		Q2FDJ8_STAA3	Capsular polysaccharide biosynthesis protein Cap1C - <i>Staphylococcus aureus</i> (strain USA300)
		ADH_STAAB	Alcohol dehydrogenase - <i>Staphylococcus aureus</i> (strain bovine RF122)
		CODY_STAAB	GTP-sensing transcriptional pleiotropic repressor codY - <i>Staphylococcus aureus</i> (strain bovine RF122)
		PANB_STAAB	3-methyl-2-oxobutanoate hydroxymethyltransferase - <i>Staphylococcus aureus</i> (strain bovine RF122)
		Q2FHT3_STAA3	Succinate dehydrogenase, flavoprotein subunit - <i>Staphylococcus aureus</i> (strain USA300)
		TPIS_STAAB	Triosephosphate isomerase - <i>Staphylococcus aureus</i> (strain bovine RF122)
		Q2FG42_STAA3	Citrate synthase II - <i>Staphylococcus aureus</i> (strain USA300)
		DNAK_STAAB	Chaperone protein dnaK - <i>Staphylococcus aureus</i> (strain bovine RF122)
		SODM_STAHL	Superoxide dismutase [Mn/Fe] - <i>Staphylococcus haemolyticus</i> (strain JCSC1435)
		FRI S6	<i>sea, seb, sek, seq</i>
379 F	<i>seh</i>	ATL_STAAC	Bifunctional autolysin precursor [Includes: N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase - <i>Staphylococcus aureus</i> (strain COL)
		ETXH_STAAU	Enterotoxin type H precursor - <i>Staphylococcus aureus</i>
		GPMA_STAAB	2,3-bisphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase
		Q1Y2T4_STAAU	Aldo/keto reductase
		SODM_STAXY	Superoxide dismutase [Mn/Fe]
352 E	<i>sec, seg, sei</i>	Q2YWM8_STAAB	Leukocidin chain lukM
		Q2YWM7_STAAB	Panton-Valentine leukocidin LukF-PV chain
		Q6DF05_XENTR	MGC89234 protein
		Q2YU85_STAAB	Beta-hemolysin
		Q2YUT1_STAAB	1-phosphatidylinositol phosphodiesterase
		ATL_STAAR	Bifunctional autolysin precursor
		HLA_STAAU	Alpha-hemolysin precursor (Alpha-toxin) (Alpha-HL)
		TSST_STAAU	Toxic shock syndrome toxin-1 precursor (TSST-1)
		Q2YVN9_STAAB	Staphylococcal enterotoxin C-bovine

Souche	Génotype (sea à seu)	Numéro d'accension (Swiss-Prot Trembl)	Description
371 F	<i>sea, sed, sej, ser</i>	Q2FFT0_STAA3	Serine protease SplB
		Q2FFS8_STAA3	Hypothetical protein
		Q1Y083_STAAU	Extracellular solute-binding protein, family 3 precursor
		HLA_STAAU	Alpha-hemolysin precursor (Alpha-toxin) (Alpha-HL)
		SSPA_STAAC	Staphylococcal serine proteinase
		CLFA_STAAC	Clumping factor A precursor (Fibrinogen-binding protein A) (Fibrinogen receptor A)
		PDXS_STAAC	Pyridoxal biosynthesis lyase pdxS
		Q1Y2R2_STAAU	Peptidase S1 and S6, chymotrypsin/Hap precursor
		ATL_STAAC	Bifunctional autolysin precursor
		Q2YWM8_STAAB	Leukocidin chain lukM
		ETXA_STAAU	Enterotoxin type A precursor (SEA)
		SODM_STAXY	Superoxide dismutase [Mn/Fe]
		Q1Y312_STAAU	Beta-lactamase-like