
**Microbiologie de la chaîne
alimentaire — Méthode horizontale
de détection des entérotoxines
staphylococciques par test immuno-
enzymatique dans les aliments**

*Microbiology of the food chain — Horizontal method for the
immunoenzymatic detection of staphylococcal enterotoxins in
foodstuffs*

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 19020:2017](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9c2f1fd9-e39e-4336-adf4-8ae5c1fb7aaf/iso-19020-2017)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9c2f1fd9-e39e-4336-adf4-8ae5c1fb7aaf/iso-19020-2017>



iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 19020:2017

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9c2f1fd9-e39e-4336-adf4-8ae5c1fb7aaf/iso-19020-2017>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2017, Publié en Suisse

Droits de reproduction réservés. Sauf indication contraire, aucune partie de cette publication ne peut être reproduite ni utilisée sous quelque forme que ce soit et par aucun procédé, électronique ou mécanique, y compris la photocopie, l'affichage sur l'internet ou sur un Intranet, sans autorisation écrite préalable. Les demandes d'autorisation peuvent être adressées à l'ISO à l'adresse ci-après ou au comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office
Ch. de Blandonnet 8 • CP 401
CH-1214 Vernier, Geneva, Switzerland
Tel. +41 22 749 01 11
Fax +41 22 749 09 47
copyright@iso.org
www.iso.org

Sommaire

Page

| | |
|--|-----------|
| Avant-propos..... | iv |
| Introduction..... | v |
| 1 Domaine d'application | 1 |
| 2 Références normatives | 1 |
| 3 Termes et définitions | 1 |
| 4 Principe | 2 |
| 5 Réactifs | 2 |
| 6 Matériel | 2 |
| 7 Échantillonnage | 3 |
| 8 Mode opératoire | 3 |
| 8.1 Préparation de la prise d'essai..... | 3 |
| 8.2 Conservation de l'échantillon pour essai..... | 4 |
| 8.3 Extraction..... | 4 |
| 8.4 Concentration de l'extrait (obligatoire pour le lait et les produits laitiers)..... | 5 |
| 8.5 Récupération de l'extrait concentré..... | 5 |
| 8.6 Conservation et étapes à suivre avant la détection..... | 6 |
| 8.7 Détection..... | 6 |
| 8.8 Critères de performance..... | 6 |
| 9 Contrôle de la qualité | 7 |
| 10 Expression des résultats | 7 |
| 11 Confirmation | 7 |
| 12 Caractéristiques de performance de la méthode | 7 |
| 13 Rapport d'essai | 9 |
| Annexe A (informative) Résultats des études interlaboratoires: 2013 | 10 |
| Annexe B (informative) Résultats des études interlaboratoires: 2014 | 14 |
| Annexe C (informative) Note concernant les interférences | 20 |
| Bibliographie | 21 |

Avant-propos

L'ISO (Organisation internationale de normalisation) est une fédération mondiale d'organismes nationaux de normalisation (comités membres de l'ISO). L'élaboration des Normes internationales est en général confiée aux comités techniques de l'ISO. Chaque comité membre intéressé par une étude a le droit de faire partie du comité technique créé à cet effet. Les organisations internationales, gouvernementales et non gouvernementales, en liaison avec l'ISO participent également aux travaux. L'ISO collabore étroitement avec la Commission électrotechnique internationale (IEC) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les procédures utilisées pour élaborer le présent document et celles destinées à sa mise à jour sont décrites dans les Directives ISO/IEC, Partie 1. Il convient, en particulier de prendre note des différents critères d'approbation requis pour les différents types de documents ISO. Le présent document a été rédigé conformément aux règles de rédaction données dans les Directives ISO/IEC, Partie 2 (voir www.iso.org/directives).

L'attention est appelée sur le fait que certains des éléments du présent document peuvent faire l'objet de droits de propriété intellectuelle ou de droits analogues. L'ISO ne saurait être tenue pour responsable de ne pas avoir identifié de tels droits de propriété et averti de leur existence. Les détails concernant les références aux droits de propriété intellectuelle ou autres droits analogues identifiés lors de l'élaboration du document sont indiqués dans l'Introduction et/ou dans la liste des déclarations de brevets reçues par l'ISO (voir www.iso.org/brevets).

Les appellations commerciales éventuellement mentionnées dans le présent document sont données pour information, par souci de commodité, à l'intention des utilisateurs et ne sauraient constituer un engagement.

(standards.iteh.ai)

Pour une explication de la nature volontaire des normes, la signification des termes et expressions spécifiques de l'ISO liés à l'évaluation de la conformité, ou pour toute information au sujet de l'adhésion de l'ISO aux principes de l'Organisation mondiale du commerce (OMC) concernant les obstacles techniques au commerce (OTC), voir le lien suivant: www.iso.org/iso/fr/avant-propos.html.

Le présent document a été élaboré par le comité technique CEN/TC 275, *Analyses alimentaires — méthodes horizontales*, du Comité européen de normalisation (CEN) en collaboration avec le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 9, *Microbiologie*, conformément à l'accord de coopération technique entre l'ISO et le CEN (Accord de Vienne).

Introduction

Les entérotoxines staphylococciques (ES) sont des protéines qui peuvent être produites dans les aliments par certaines souches de staphylocoques à coagulase positive (SCP), essentiellement *Staphylococcus aureus*. Ces ES sont des toxines stables à la chaleur et aux acides pouvant provoquer des nausées, des vomissements, des douleurs abdominales et des diarrhées en cas d'ingestion. En raison de leur stabilité, les ES peuvent être présentes même lorsque des staphylocoques à coagulase positive ne peuvent pas être détectés. Les ES représentent une famille de plus de 20 protéines monomériques globulaires structurellement liées de masse moléculaire de 19 kDa à 30 kDa^[1]. Ces protéines sont relativement stables dans des conditions environnementales changeantes, comme le traitement thermique, la congélation et les variations de pH; en outre, elles sont résistantes à la digestion protéolytique. Typiquement, et selon la sensibilité des personnes concernées, une quantité d'entérotoxines de l'ordre des nanogrammes (ng) peut provoquer une intoxication avec les symptômes décrits ci-dessus. Compte tenu de leur pouvoir pathogène pour l'homme, l'Union européenne a adopté une législation afin d'améliorer la protection des consommateurs en définissant des critères microbiologiques pour les aliments, comme le dénombrement des SCP et la détection des ES^[2].

Plusieurs méthodes ont été développées pour détecter et/ou quantifier les ES. Certaines de ces méthodes sont de type immuno-enzymatique (EIA). D'autres méthodes sont basées sur une analyse chimique par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) pour détecter et quantifier les ES. Ces dernières méthodes étant en cours de développement, les méthodes EIA ont été choisies comme point de départ pour la normalisation d'une méthode de détection des ES.

Le but est de détecter les ES au moyen de trousse de diagnostic disponibles dans le commerce. Le présent document décrit le protocole permettant d'extraire les ES à partir d'échantillons alimentaires. En outre, les critères de performance de ces trousse ont été évalués avant utilisation sur cinq types de matrices alimentaires, sur la base des critères fournis dans le présent document.

Les taux de réponse issus de différentes toxi-infections alimentaires à staphylocoques ont été modélisés en fonction des doses ingérées.^[3] Pour cela, des données tirées de la littérature ainsi que des données fournies par le Laboratoire de Référence de l'Union européenne pour les SCP ont été utilisées.

La méthodologie de «benchmark dose» de l'Agence de protection environnementale des États-Unis (US EPA) a été appliquée à cet ensemble de données et a servi à établir la Bench Mark Dose (BMD).^[4] La BMD est définie comme la dose d'un danger (entérotoxine staphylococcique) susceptible de déclencher des symptômes dans un pourcentage donné de la population exposée. La limite inférieure de la BMD (BMDL) est la limite inférieure de l'intervalle de confiance à 95 % (ou 90 %) de la BMD. Cette valeur a été utilisée pour fixer la valeur acceptable du niveau de détection relatif 50 (LOD₅₀) des diverses trousse de détection des ES disponibles dans le commerce.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 19020:2017

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9c2f1fd9-e39e-4336-adf4-8ae5c1fb7aaf/iso-19020-2017>

Microbiologie de la chaîne alimentaire — Méthode horizontale de détection des entérotoxines staphylococciques par test immuno-enzymatique dans les aliments

1 Domaine d'application

Le présent document décrit une méthode de recherche pour la détection des entérotoxines staphylococciques SEA, SEB, SEC, SED et SEE dans les aliments. Elle se compose de deux étapes principales: a) une extraction suivie d'une concentration basée sur le principe de la dialyse; et b) une détection immuno-enzymatique au moyen de trousse de détection disponibles dans le commerce.

Le présent document s'applique à la recherche des entérotoxines staphylococciques SEA à SEE dans les produits destinés à la consommation humaine.

D'autres entérotoxines staphylococciques, telles que les types SEG, SEH, SEI, SER, SES et SET, peuvent également provoquer des intoxications alimentaires. En raison de l'absence de trousse de détection disponibles dans le commerce, le présent document ne s'applique qu'aux types SEA à SEE, mais peut s'appliquer à d'autres types de toxines, sous réserve de validation de la méthode.

2 Références normatives (standards.iteh.ai)

Les documents suivants cités dans le texte constituent, pour tout ou partie de leur contenu, des exigences du présent document. Pour les références datées, seule l'édition citée s'applique. Pour les références non datées, la dernière édition du document de référence s'applique (y compris les éventuels amendements).

ISO 3696, *Eau pour laboratoire à usage analytique — Spécification et méthodes d'essai*

ISO 7218, *Microbiologie des aliments — Exigences générales et recommandations*

3 Termes et définitions

Pour les besoins du présent document, les termes et définitions suivants s'appliquent.

L'ISO et l'IEC tiennent à jour des bases de données terminologiques destinées à être utilisées en normalisation, consultables aux adresses suivantes:

- IEC Electropedia: disponible à l'adresse <http://www.electropedia.org/>;
- ISO Online browsing platform: disponible à l'adresse <http://www.iso.org/obp>.

3.1

entérotoxine staphylococcique A, B, C, D, E SEA, SEB, SEC, SED, SEE

exoprotéine SEA, SEB, SEC, SED et SEE produite par des souches entérotoxigènes de staphylocoques à coagulase positive, essentiellement *Staphylococcus aureus*, de masse moléculaire comprise entre 19 kDa et 30 kDa

3.2

spécificité SP

nombre d'échantillons trouvés négatifs divisé par le nombre total d'échantillons blancs soumis à essai

3.3
sensibilité
SE

nombre d'échantillons trouvés positifs divisé par le nombre total d'échantillons soumis à essai à un niveau donné de contamination

3.4
niveau de détection relatif 50 %
LOD₅₀

concentration (ng d'ES/g) pour laquelle la probabilité de détection est de 50

3.5
benchmark dose
BMD

dose d'un danger (entérotoxine staphylococcique, par exemple) susceptible de déclencher des symptômes dans un pourcentage donné de la population exposée

4 Principe

Le présent document décrit une méthode pour la détection des entérotoxines staphylococciques (SEA à SEE) dans tous les aliments; cette méthode est constituée de deux étapes principales: a) une extraction suivie d'une concentration basée sur le principe de la dialyse; et b) une détection immuno-enzymatique au moyen de trousse de détection disponibles dans le commerce.

5 Réactifs

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

Sauf spécification contraire, utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue.

5.1 Eau distillée ou déminéralisée ou eau de qualité équivalente conformément à l'ISO 3696.
ISO 19020:2017
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/9020/19020-2017-c59c-4536-adf4-8ae5c1fb7aaf/iso-19020-2017

5.2 Acide chlorhydrique (par exemple, concentrations 5N, 1N ou autres dilutions).

5.3 Hydroxyde de sodium (par exemple, concentrations 5N, 1N ou autres dilutions).

5.4 PBS (tampon phosphate, Phosphate Buffer Saline), pH 7,3 ± 0,2 [NaCl/Na₂HPO₄: 145 mM/10 mM].

5.5 PEG, solution de polyéthylène glycol de masse moléculaire égale à 20 000 g/mol.

Préparer une solution concentrée de PEG: peser 30 g de poudre de PEG et ajouter 70 ml d'eau (5.1).

5.6 Solution de nettoyage d'électrode (par exemple éthanol à 70 %).

5.7 Trousse de détection immuno-enzymatique dédiée aux ES. Les trousse doivent satisfaire aux critères de performance énoncés en 8.7.

6 Matériel

Matériel de laboratoire de microbiologie (conforme à l'ISO 7218) et, en particulier, le matériel suivant.

6.1 Mélangeur.

6.2 Balance.

6.3 Équipement d'homogénéisation, par exemple homogénéisateur rotatif, mélangeur ou homogénéisateur péristaltique.

Il est fortement recommandé d'utiliser un homogénéisateur rotatif, en particulier pour tous les types d'aliments difficiles à broyer, pour obtenir un échantillon homogène. Avec un homogénéisateur péristaltique, utiliser uniquement des sacs sans filtre.

6.4 Agitateur à température ambiante, par exemple, agitateur orbital, agitateur magnétique, etc.

6.5 pH-mètre et électrode, par exemple, électrode combinée.

6.6 Centrifugeuse, pouvant fonctionner à au moins 3 130g, si possible pouvant être réfrigérée.

6.7 Membrane de dialyse, ayant un seuil de rétention des molécules (MWCO) allant de 6 000 Da à 8 000 Da.

6.8 Pincés de fermeture pour membrane de dialyse.

6.9 Matériel de filtration, par exemple entonnoir et coton de verre, laine de verre, etc.

6.10 Plateau.

6.11 Réfrigérateur ($\pm 3\text{ °C}$ ou $\pm 2\text{ °C}$ ou $\pm 5\text{ °C}$ ou $\pm 3\text{ °C}$) et **congélateur** ($\leq -18\text{ °C}$).

6.12 Matériel de laboratoire en verre ou en polypropylène pour éviter l'adsorption des toxines (entonnoir, bécher, flacon, tube de centrifugation...).

6.13 Équipement adapté à la trousse de détection utilisée, voir [5.7](#).

6.14 Bain d'eau ($38\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$).

7 Échantillonnage

L'échantillonnage ne fait pas partie de la méthode spécifiée dans le présent document.

8 Mode opératoire

8.1 Préparation de la prise d'essai

Dans le cas d'un fromage à croûte, prendre environ 10 % de croûte et 90 % de pâte.

Les entérotoxines pouvant être distribuées de manière hétérogène dans l'échantillon, si possible, mixer et homogénéiser la totalité de l'échantillon ou une portion représentative de celui-ci à l'aide d'un mélangeur ([6.1](#)). Utiliser 25 g d'échantillon homogénéisé comme prise d'essai.

En cas de suspicion d'une toxi-infection alimentaire à staphylocoques, la prise d'essai peut être inférieure à 25 g. Réaliser l'analyse comme décrit ci-dessous et adapter les étapes [8.3.1](#) à [8.5.2](#) en conséquence. Il convient que le rapport masse de la prise d'essai/masse de l'extrait concentré ([8.5.2](#)) soit très proche de cette valeur [par exemple, 25 g de prise d'essai pour 5,0 g à 5,5 g (maximum 5,8 g pour les extraits visqueux) d'extrait concentré, 12,5 g de prise d'essai pour 2,5 g à 2,8 g (maximum 2,9 g pour les extraits visqueux) d'extrait concentré].

8.2 Conservation de l'échantillon pour essai

Il est recommandé de conserver les échantillons à $3\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ ou $5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ (6.11) avant analyse.

Si l'analyse ne peut pas être réalisée dans les 24 h, il est possible de congeler les échantillons. Dans ce cas, décongeler totalement les échantillons à $3\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ ou $5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ avant de commencer l'analyse.

Pour éviter la perte de toxines, il est fortement recommandé de ne pas congeler et décongeler les échantillons de manière répétée avant l'analyse.

8.3 Extraction

8.3.1 Ajouter environ 40 ml d'eau (5.1) à $38\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ aux 25 g de prise d'essai, sauf s'il s'agit de produits liquides. Pour les produits liquides, procéder directement comme décrit en 8.3.2. En cas de toxi-infection alimentaire à staphylocoques et pour une prise d'essai inférieure à 25 g, réduire la quantité d'eau (5.1) selon le rapport égal.

Homogénéiser le mélange à l'aide d'un homogénéisateur rotatif ou d'un mélangeur (6.3). Cette étape est particulièrement importante dans le cas des produits à teneur élevée en matière grasse. Il est recommandé d'utiliser un homogénéisateur rotatif pour tous les types d'échantillons alimentaires difficiles à broyer, pour obtenir un échantillon homogène.

8.3.2 Récupérer la totalité de l'échantillon et rincer le système (tige de l'homogénéisateur rotatif, sac du Stomacher ou bol du mélangeur) avec un volume minimum d'eau distillée (5.1).

NOTE Plus le volume de liquide utilisé est important, plus la membrane de dialyse doit être longue.

8.3.3 Laisser les toxines diffuser en agitant l'échantillon (6.4) à température ambiante (de 18 °C à 27 °C) pendant 30 min à 60 min.

8.3.4 Acidifier le mélange avec des solutions d'acide chlorhydrique appropriées (5.2) afin d'obtenir un pH compris entre 3,5 et 4,0, mesuré à l'aide d'un pH-mètre (6.5).

8.3.5 Centrifuger la totalité du mélange à $3\ 130\ g$ minimum pendant 15 min à température de réfrigération (environ 4 °C) ou à température ambiante (de 18 °C à 27 °C) (6.6).

En cas d'échantillons gras, une centrifugation à température de réfrigération (environ 4 °C) est recommandée pour éliminer les particules de matière grasse avant la dialyse.

8.3.6 Récupérer le surnageant dans un bécher (6.12). Si le surnageant est opaque, répéter la centrifugation comme décrit en 8.3.5. Après centrifugation, le pH doit être compris entre 3,0 et 4,5.

Si le pH est $> 4,5$, procéder à une nouvelle acidification comme décrit en 8.3.4.

Si le pH est $< 3,0$, la structure tridimensionnelle des ES est susceptible d'être endommagée. Réaliser une autre prise d'essai de 25 g et procéder comme décrit en 8.3.1.

8.3.7 Neutraliser le mélange avec des solutions d'hydroxyde de sodium appropriées (5.3) afin d'obtenir un pH compris entre 7,4 et 7,6.

Si le pH est $> 9,0$, la structure tridimensionnelle des ES est susceptible d'être endommagée. Réaliser une autre prise d'essai de 25 g et procéder comme décrit en 8.3.1.

8.3.8 Centrifuger conformément à 8.3.5.

8.3.9 Récupérer la totalité de la phase aqueuse neutralisée pour l'étape de concentration.

Pour récupérer une quantité maximale de toxines, à la fin des étapes d'acidification et de neutralisation, rincer l'électrode et le bécher avec quelques gouttes d'eau (5.1).

En cas d'échantillons à très forte teneur en matière grasse, l'électrode du pH-mètre peut être nettoyée en utilisant de l'éthanol à 70 % (5.6) pour dissoudre les particules de matière grasse une fois l'analyse terminée.

8.3.10 Autre mode opératoire d'extraction (facultatif).

Ce mode opératoire alternatif ne peut être utilisé que dans certains cas limités, tels qu'une suspicion d'intoxication alimentaire, et il ne peut pas être utilisé pour les aliments contenant du lait ou des produits laitiers. Cet autre mode opératoire diffère du mode opératoire décrit ci-dessous par l'absence de l'étape de concentration par dialyse.

- Prélever le volume nécessaire (selon la trousse utilisée) de la phase aqueuse neutralisée obtenue à l'étape 8.3.9 et procéder à l'étape de détection 8.7. Conserver la phase aqueuse neutralisée restante à $3\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ ou $5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$.
- Si un résultat négatif est obtenu, il est nécessaire de procéder à l'étape de concentration, le même jour, comme décrit en 8.4, avec la phase aqueuse neutralisée restante.

Si ce mode opératoire n'est pas strictement respecté, il convient d'analyser une nouvelle prise d'essai.

8.4 Concentration de l'extrait (obligatoire pour le lait et les produits laitiers)

8.4.1 Pour chaque échantillon, utiliser la solution de PEG préparée conformément à 5.5.

8.4.2 Découper un morceau d'une membrane de dialyse (6.7) avec une longueur suffisante pour contenir l'extrait entier.

8.4.3 Tremper la membrane dans l'eau (5.1) pour la réhydrater, en respectant les instructions du fabricant (par exemple, au moins pendant 30 min à température ambiante).

Avant utilisation, rincer la membrane (parties interne et externe) avec de l'eau (5.1).

8.4.4 Verrouiller une extrémité de la membrane avec une pince de fermeture (6.8).

8.4.5 Verser la totalité de la phase aqueuse neutralisée (8.3.9) dans la membrane préparée en utilisant un entonnoir et un petit morceau de matériau filtrant (6.9) pour éliminer les particules en suspension. Verrouiller l'autre extrémité de la membrane avec une seconde pince de fermeture (6.8).

8.4.6 Déposer la membrane de dialyse remplie dans un plateau (6.10) rempli de solution de PEG (5.5).

8.4.7 Laisser l'extrait se concentrer pendant une nuit à $3\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ ou $5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ (6.11). Si l'extrait n'est pas suffisamment concentré (c'est-à-dire il reste plus de 5 ml dans la membrane de dialyse), le laisser dans la solution de PEG plus longtemps (jusqu'à 3 jours) ou ajouter de la poudre de PEG sur la membrane.

8.5 Récupération de l'extrait concentré

8.5.1 Sortir la membrane de dialyse de la solution de PEG et rincer les parties externes de la membrane avec de l'eau (5.1) pour éliminer toute trace de solution de PEG.