Ordre de méthode

Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

MINISTÈRE
DE L'AGRICULTURE
ET DE
L'ALIMENTATION

Direction générale de l'alimentation **Service de l'alimentation** **Sous-direction de la sécurité sanitaire des aliments** **Bureau d'appui à la surveillance de la chaîne alimentaire** **251 rue de Vaugirard** **75 732 PARIS CEDEX 15** **0149554955** **Direction générale de l'alimentation** **Service de l'alimentation** **Sous-direction de la politique de l'alimentation** **Bureau de l'évaluation scientifique, de la recherche et des laboratoires**	**Instruction technique** **DGAL/SDSSA/2020-793** **17/12/2020**

Date de mise en application : Immédiate
Diffusion : Tout public

Date limite de mise en œuvre : 18/12/2020
Cette instruction abroge :
DGAL/SDSSA/SDPRAT/N2013-8120 du 17/07/2013 : Recherche des entérotoxines staphylococciques de type SEA à SEE dans les aliments – Dispositions relatives aux méthodes d'analyse pour les analyses officielles
Cette instruction ne modifie aucune instruction.
Nombre d'annexes : 1

Objet : Recherche des entérotoxines staphylococciques de type SEA à SEE dans les aliments - Dispositions relatives aux méthodes d'analyse pour les analyses officielles

Destinataires d'exécution
DD(CS)PP DRAAF DAAF SIVEP Laboratoires agréés en microbiologie des aliments LNR : Anses - Laboratoire de sécurité des aliments - site de Maisons-Alfort

Résumé : Cette note de service décrit les dispositions relatives aux méthodes d'analyses pour les

analyses officielles de recherche d'entérotoxines de staphylocoques à coagulase positive dans les aliments. La prise d'essais, l'échantillonnage, les conditions de l'agrément des laboratoires sont également décrits. Les sections modifiées par rapport à la note de service DGAL/SDSSA/SDPRAT/N2013-8120 sont surlignées. Compte-tenu de l'objet de cette instruction technique, les paragraphes de la note de service DGAL/SDSSA/SDPRAT/N2013-8120 consacrés aux mesures de gestion à mettre en œuvre dans le cas d'un échantillon positif confirmé par le LNR ont été retirés.

Textes de référence :- Règlement (CE) n° 2073/2005 de la Commission du 15 novembre 2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires ;
- Règlement (UE) 2017/625 du Parlement européen et du Conseil du 15 mars 2017 concernant les contrôles officiels et les autres activités officielles servant à assurer le respect de la législation alimentaire et de la législation relative aux aliments pour animaux ainsi que des règles relatives à la santé et au bien être des animaux, à la santé des végétaux et aux produits phytopharmaceutiques, modifiant les règlements du Parlement européen et du Conseil (CE) n° 999/2001, (CE) n° 396/2005, (CE) n° 1069/2009, (CE) n° 1107/2009, (UE) n° 1151/2012, (UE) n° 652/2014, (UE) 2016/429 et (UE) 2016/2031, les règlements du Conseil (CE) n° 1/2005 et (CE) n° 1099/2009 ainsi que les directives du Conseil 98/58/CE, 1999/74/CE, 2007/43/CE, 2008/119/CE et 2008/120/CE, et abrogeant les règlements du Parlement européen et du Conseil (CE) n° 854/2004 et (CE) n° 882/2004, les directives du Conseil 89/608/CEE, 89/662/CEE, 90/425/CEE, 91/496/CEE, 96/23/CE, 96/93/CE et 97/78/CE ainsi que la décision 92/438/CEE du Conseil (règlement sur les contrôles officiels) ;
- Règlement (UE) 2019/229 de la Commission du 7 février 2019 modifiant le règlement (CE) n° 2073/2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires en ce qui concerne certaines méthodes,le critère de sécurité des denrées alimentaires relatif à la présence de Listeria monocytogenes dans les graines germées, ainsi que le critère d'hygiène du procédé et le critère de sécurité des denrées alimentaires pour les jus de fruits et de légumes non pasteurisés (prêts à être consommés) ;
- Articles L. 202-1, R. 200-1 et R. 202-8 à R. 202-21 du code rural et de la pêche maritime ;
- Arrêté du 19 décembre 2007 fixant les conditions générales d'agrément des laboratoires d'analyses dans le domaine de la santé publique vétérinaire et de la protection des végétaux.

I - Contexte

Le Laboratoire National de Référence (LNR) pour les staphylocoques à coagulase positive (SCP) et les entérotoxines staphylococciques a piloté, dans le cadre d'un mandat de la Commission européenne au Comité européen de normalisation (CEN), le développement de la norme européenne et internationale EN ISO 19020 pour effectuer la détection d'entérotoxines staphylococciques de type SEA à SEE dans tout type de matrices alimentaires.

Cette norme comporte deux étapes principales :
a) une extraction suivie d'une concentration fondée sur le principe de la dialyse ;
b) une détection immuno-enzymatique au moyen de trousses de détection disponibles dans le commerce.

Cette norme s'applique à la détection des entérotoxines staphylococciques de types SEA à SEE, à l'origine d'intoxications alimentaires, 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 trousses de détection disponibles dans le commerce pour ces autres types, la norme n'a été validée que pour les types SEA à SEE, mais elle peut s'appliquer à d'autres types de toxines, sous réserve de validation de la méthode.

Cette norme (NF EN ISO 19020), publiée par l'Afnor en août 2017, a été intégrée comme méthode de référence pour le critère relatif aux entérotoxines de staphylocoques dans une modification du règlement européen relatif aux critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires (§ 1.b.ii de l'annexe du règlement (UE) 2019/229 du 7 février 2019 modifiant le règlement (CE) n°2073/2005) et est d'application depuis le 28 février 2019.

Une étude d'impact du remplacement de la méthode Anses Maisons-Alfort CAT-BAC 06, précédente méthode officielle, par la Norme NF EN ISO 19020 a été réalisée par le LNR SCP et diffusée à l'ensemble des laboratoires agréés pour accompagner ce changement de méthode avec maintien de l'accréditation des laboratoires officiels.

II - Prise d'essais et échantillonnage

A - Prise d'essai

Une prise d'essai de 25 g est nécessaire pour effectuer la recherche des entérotoxines staphylococciques. Lors du prélèvement, il convient de prendre en compte également la réalisation du dénombrement des staphylocoques à coagulase positive, ainsi que la nécessité de procéder éventuellement à une analyse de confirmation par le LNR SCP.

En conséquence, la quantité d'échantillon prélevée devra être suffisante pour réaliser :

- le dénombrement des staphylocoques à coagulase positive (10 g),
- la recherche de première intention des entérotoxines staphylococciques (25 g),
- la confirmation par le LNR d'un éventuel résultat positif à l'analyse de première intention (50 g).

Il faut donc prélever, **au minimum, un total de 85 g pour chaque unité** composant l'échantillon.

Cas particulier des fromages comportant une croûte : il conviendra de veiller à ce que chaque unité de l'échantillon soumis à analyse, comporte 10% de croûte pour 90% de pâte.

En cas de toxi-infection alimentaire à staphylocoques, la masse de l'échantillon analysé (prélèvement officiel de la DD(CS)PP ou DAAF) peut être inférieure à 25 g. La masse finale de l'extrait concentré sera ajustée pour obtenir un rapport de 1 à 5 entre la masse d'extrait concentré et la masse de la prise d'essai. Le LNR SCP recommande fortement de ne pas descendre en-dessous de 10 g afin de pouvoir procéder éventuellement à une analyse de confirmation.

Dans le cas des échantillons prélevés dans le cas d'autres contrôles officiels, la mise en place des analyses des échantillons dont la masse est inférieure à 25g sera étudiée au cas par cas.

En revanche, en cas d'autocontrôle, le LNR SCP se réserve le droit de refuser l'échantillon si la masse envoyée est inférieure à 25 g.

B - Échantillonnage

Dans le cas de contrôles officiels, il convient d'avoir recours à un plan d'échantillonnage de type n=5, conformément au règlement (CE) n°2073/2005 modifié, ou plus; les unités doivent être représentatives du lot.

Cas particulier des fromages : les cinq unités composant l'échantillon, représentatives du lot à analyser, seront constituées de la manière suivante :

- cinq fromages, s'il s'agit de petits fromages (d'un poids unitaire inférieur à un kilogramme) et ce, quelle que soit la taille du lot ;
- cinq prélèvements effectués au sein de plusieurs fromages, si ceux-ci sont d'un poids supérieur à un kilogramme :
    - si le lot est constitué de moins de 500 fromages, les cinq unités de l'échantillon seront prélevées à partir de deux fromages distincts,
    - si le lot est constitué de plus de 500 fromages, le prélèvement sera réalisé à partir de trois fromages distincts.

Rappels :

Tout plan d'échantillonnage présente une limite dans sa capacité à détecter une contamination. Un plan d'échantillonnage de type n=5 est le plan à suivre pour les contrôles officiels, en considérant que les mesures de maitrise de l'hygiène du procédé sont satisfaisantes. Le cas échéant, le nombre d'unités peut être augmenté pour réduire la probabilité d'accepter, à tort, un lot contaminé (cf. Note de service DGAL/SDSSA/N2008-8009 modifiée par la note de service DGAL/SDSSA/N2010-8245).

III - Méthodes autorisées pour les analyses officielles dans les aliments

La Norme NF EN ISO 19020 comporte deux étapes, une extraction (suivie ou non d'une concentration par dialyse) puis une étape de détection par trousse commerciale (figure 1).

Les laboratoires peuvent ne pas mettre en œuvre l'étape de concentration par dialyse après extraction. Dans ce cas, si un résultat négatif est obtenu lors de la détection, il faut effectuer une nouvelle analyse avec mise en œuvre de l'étape de concentration par dialyse.

Cependant, cette étape de concentration demeure obligatoire si l'aliment à analyser contient du lait ou un produit laitier, quel que soit le contexte analytique (autocontrôle, contrôle officiel, PS/PC, investigation de TIAC).

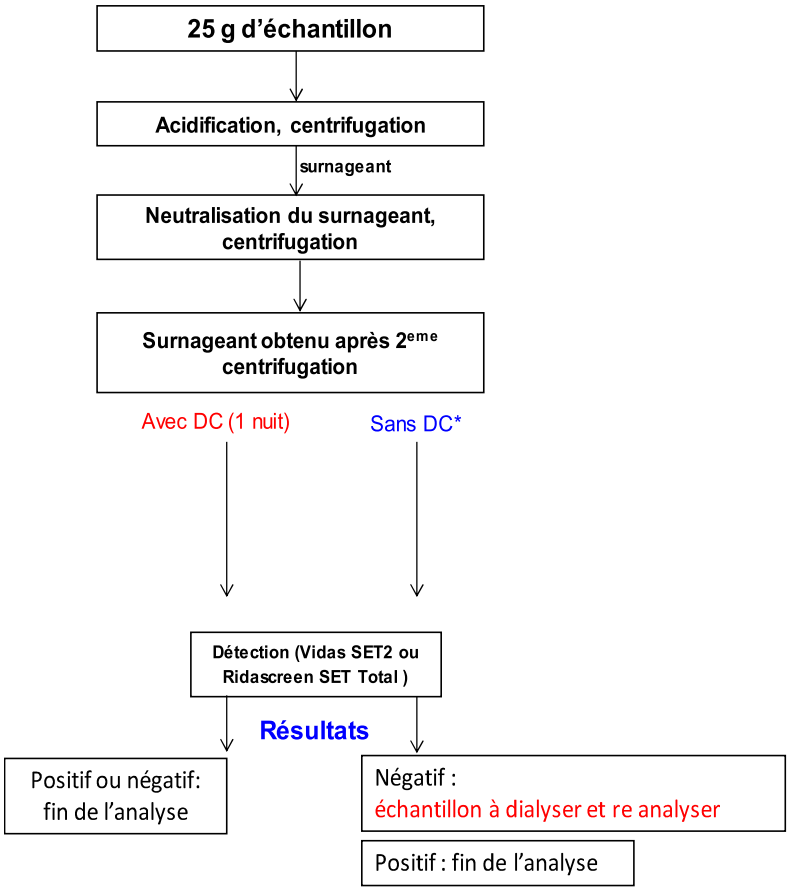


Figure 1 : Schéma simplifié des étapes de la Norme NF EN ISO 19020

Au vu des résultats obtenus lors des essais interlaboratoires de validation de cette méthode normalisée, le LNR SCP recommande fortement la mise en place de la méthode avec concentration par dialyse.

Les trousses d'analyse qui respectent les critères de performance définis dans la norme en termes de sensibilité, spécificité et de LOD50 sont autorisées pour la détection des entérotoxines staphylococciques de type SEA à SEE dans les produits laitiers et les autres matrices alimentaires.

La liste des trousses autorisées est consultable sur le site Internet du ministère chargé de l'agriculture à l'adresse suivante : https://agriculture.gouv.fr/laboratoires-agrees-et-reconnus-methodes-officielles-en-alimentation (Microbiologie alimentaire - Liste des méthodes officielles et des réactifs autorisés).

En vue d'audit et parce que la norme laisse le choix de la procédure d'extraction et de détection, quelle que soit l'option choisie, les laboratoires sont tenus de préciser dans leur documentation la démarche analytique qu'ils mettent en œuvre.

A titre de rappel, pour les matrices crues dans lesquelles les staphylocoques à coagulase positive n'ont pas été dénombrés et/ou pour les matrices dont les caractéristiques physico-chimiques ne permettent pas le développement de staphylocoques à coagulase positive, la mise en œuvre de la méthode de détection des entérotoxines staphylococciques n'est pas pertinente.

Avertissement : lors des essais interlaboratoires de validation, seules cinq matrices alimentaires (plat cuisiné, produit de la pêche, dessert, produit carné et fromage) ont été testées. En revanche, dans le cadre d'une éventuelle application de cette méthode sur des produits alimentaires d'une grande diversité, il se peut que certains ne puissent répondre strictement de la même manière (exemple des aliments de type féculents, végétaux et céréales).

IV - Conséquences sur l'agrément des laboratoires

A - Liste des laboratoires agréés

Les laboratoires sont agréés pour la recherche des entérotoxines staphylococciques sur toute matrice alimentaire.

La liste des laboratoires agréés est consultable sur le site internet du ministère chargé de l'agriculture https://agriculture.gouv.fr/laboratoires-agrees-et-reconnus-methodes-officielles-en-alimentation

Microbiologie alimentaire - Liste des laboratoires agréés.

Les laboratoires qui figurent sur cette liste, dès lors qu'ils remplissent les conditions suivantes, peuvent réaliser les analyses sur toute matrice alimentaire et utilisent une trousse autorisée pour ces analyses.

B - Accréditation

- Les laboratoires sont tenus d'utiliser la Norme NF EN ISO 19020 depuis le 28 février 2019.
- Leur accréditation selon la Norme NF EN 17025 : 2017 sur la norme NF EN ISO 19020 est conditionnée par le respect des exigences du Cofrac, notamment au regard de leur participation à deux campagnes annuelles d'EILA dont une organisée par le LNR SCP.

V - Gestion des échantillons positifs dans le cadre des contrôles officiels

Le règlement (CE) n°2073/2005 fixe un critère de sécurité relatif aux entérotoxines staphylococciques pour les produits laitiers (chapitre 1 de l'annexe I) et des critères d'hygiène des procédés relatifs aux staphylocoques à coagulase positive dans les produits laitiers et les crustacés et mollusques cuits (chapitre 2.2 de l'annexe I). En ce qui concerne les produits laitiers, une détection de concentration en staphylocoques à coagulase positive supérieure à 10^5 ufc/g entraine la recherche des entérotoxines staphylococciques. Par ailleurs, la détection confirmée d'entérotoxines staphylococciques dans tout échantillon rend la denrée alimentaire potentiellement dangereuse, au titre de l'article 14 du règlement (CE) n°178/2002.

Lorsqu'un échantillon est trouvé positif vis-à-vis des entérotoxines staphylococciques, c'est-à-dire lorsque la valeur du test de la méthode officielle est supérieure ou égale au seuil de positivité, l'analyse doit faire l'objet d'une confirmation par le LNR SCP, sur le même échantillon ou un échantillon associé le cas échéant.

Dans ce cas, le LNR SCP met en place la Norme NF EN ISO 19020 en utilisant dans la mesure du possible une trousse de détection différente de celle utilisée en analyse de première intention ou toute autre méthode capable de confirmer le résultat obtenu.

Il est demandé aux laboratoires de faire parvenir au LNR SCP dans le même colis :

- le(s) échantillon(s) concerné(s), clairement identifié(s) ;
- 5 souches de staphylocoques à coagulase positive, isolées du(des) échantillon(s), en tube de gélose longue conservation et sous triple emballage, pour caractérisation des souches en cas de toxines détectées dans la matrice ; dans le cas où le lot est composé de plusieurs unités, les souches de SCP à envoyer devront provenir de la (ou des) unité(s) présentant un dénombrement supérieur à 10^5 ufc/g ;
- la fiche de demande d'analyse (annexe I) dûment complétée.

Toute demande incomplète ou ne respectant pas les critères énoncés ci-dessus sera rejetée.

En cas de TIAC, le laboratoire fait parvenir au LNR SCP, dans le même colis :

- Le cas échéant en cas de staphylocoques dénombrés, 5 souches de staphylocoques à coagulase positive, isolées des aliments suspectés, en tube de gélose longue conservation et sous triple emballage,
- la fiche de demande d'analyse (annexe I) dûment complétée (trois pages). Il est demandé aux laboratoires agréés de se rapprocher de la DD(CS)PP et/ou de l'ARS pour renseigner la page 3/3 de cette annexe.
- Toute demande incomplète ou ne respectant pas les critères énoncés ci-dessus sera rejetée.

Le Directeur général de l'alimentation

BRUNO FERREIRA ID

Signature numérique de BRUNO FERREIRA ID
Date : 2020.12.17 20:06:09 +01'00'

Bruno Ferreira

ANNEXE I

Demande d'analyse de confirmation
« Entérotoxines staphylococciques dans des aliments »

(Remplir une fiche de demande par échantillon à analyser) 1/3

DEMANDEUR	**DESTINATAIRE** (adresse de livraison des échantillons)
Nom et adresse : Tél. : N° de dossier : Date et signature :	ANSES – Laboratoire de Sécurité des Aliments - site de Maisons-Alfort Unité SBCL – équipe Staphylocoques Bâtiment Monod 14, rue Pierre et Marie Curie 94700 Maisons-Alfort Contacts : LNR-Staphylocoques@anses.fr 01 49 77 27 56 / 01 49 77 27 54 / 01 49 77 46 12

Lieu de prélèvement :

……..

Descriptif de l'échantillon :

❑ Produit laitier ❑ Produit carné ❑ Produit de la pêche ❑ Plat préparé ❑ Autre aliment

Préciser (désignation) : ……

Dans le cas d'un produit laitier, merci de préciser :

Origine du lait de fabrication	❑ Vache ❑ Chèvre ❑ Brebis ❑ Autre (préciser ……..)
Type de lait	❑ Cru ❑ Autre (préciser……..)
Type de fromage	❑ Pâte pressée non cuite ❑ Pâte molle ❑ Autre (préciser……..)

Nombre d'unités composant l'échantillon : 1 ❑ 2 ❑ 3 ❑ 4 ❑ 5 ❑

Observations particulières :……

Contexte de l'analyse demandée au LNR :

❑ **Confirmation :** suite à ❑ contrôle officiel ❑ TIAC (préciser le n° de TIAC :……..……)
❑ auto-contrôle ❑ autre (préciser) :

❑ **Alerte :** ❑ non
❑ oui : ❑ **alerte nationale** ❑ alerte locale (préciser le n° d'alerte :……..……..……)

Référence de l'échantillon					
Origine de l'échantillon (département)					
Nombre de SCP / g (pour chaque unité composant l'échantillon)	Unité 1	Unité 2	Unité 3	Unité 4	Unité 5
Souches de SCP Votre référence	Souche 1	Souche 2	Souche 3	Souche 4	Souche 5
Référence du LNR SCP (ne pas compléter)					
Méthode de détection utilisée	❑ Ridascreen SET Total ❑ Vidas SET2 ❑ autre …… N° lot kit : ……..				
Résultat entérotoxines staphylococciques	Seuil de positivité : …… Résultat brut du test (exemple : valeur VT ou UA) : ……				
Réalisation d'un test d'interférences	❑ oui ❑ non Si oui, quel est le résultat ?.....				
Problème(s) rencontré(s) ou commentaire(s)					

<u>Envoi des résultats :</u>

❑ **<u>Original des résultats à</u> :** ❑ **<u>Copie des résultats à</u> :**

<u>Facturation des résultats à</u> :

Demande d'analyse de confirmation

« Entérotoxines staphylococciques dans des aliments » 3/3

A compléter dans le cas où l'aliment est suspecté dans une TIAC. Merci de transmettre au LNR SCP tout élément d'information disponible concernant la TIAC

Nombre de malades / nombre de repas servis :

Contact DD(CS)PP/DRAAF et/ou ARS pour complément d'informations (nom, téléphone) :

			symptômes (présence : x / absence : -)								
sexe (M ou F)	âge (ans)	poids (kg)	douleurs abdominales	diarrhée	nausées	vomissements	fièvre	autre	délai d'apparition symptômes (h)	durée symptômes (h)	quantité d'aliment consommée (g)