ORDRE DE SERVICE

Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

MINISTERE DE L'AGRICULTURE
ET DE LA PECHE

Direction générale de l'alimentation

Sous-direction de la sécurité sanitaire des aliments
Bureau des établissement de production et de transformation

Sous-direction de la réglementation, de la recherche et de la coordination des contrôles
Bureau de la recherche et des laboratoires d'analyses

Adresse : 251 rue de Vaugirard
75732 PARIS CEDEX 15

Suivi par : Valérie VION
Et A. BLANC-GONNET

Tél : 01 49 55 84 10 - 01 49 55 81 49

NOTE DE SERVICE

DGAL/SDSSA/SDRRCC/N2006-8210

Date: 23 août 2006

Date de mise en application : immédiate

Abroge et remplace : la note de service DGAl/SDSSA/N2005-8194 du 27 juillet 2005 relative au même objet.

Nombre d'annexes: 3
Degré et période de confidentialité : aucun

Le Ministre de l'agriculture et de la pêche
à
Mesdames et Messieurs les Préfets

A l'attention de Mesdames et Messieurs les Directeurs départementaux des services vétérinaires

Objet : Techniques de détection des entérotoxines staphylococciques dans les produits laitiers.

Bases juridiques :

- Réglement (CE) n° 2073/2005 de la Commission du 15 novembre 2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires.
- Note de service DGAL/SDSSA/N2006-8084 du 20 Février 2006 (relative à la mise en place du règlement ci-dessus)

Résumé : Suite à l'organisation d'un essai interlaboratoires de validation de méthode par l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA-LERQAP), vous trouverez ci-après les instructions relatives à la mise en œuvre des méthodes de détection des entérotoxines dans les produits laitiers ainsi que la démarche à suivre pour faire confirmer les résultats positifs.

Mots-clés : Produits laitiers - Entérotoxines - *Staphylococcus aureus*

Destinataires	
Pour exécution : - Directeurs Départementaux des Services Vétérinaires - Laboratoires Vétérinaires Départementaux - Laboratoire National Vétérinaire de Rungis	**Pour information :** - Préfets - DRAF / DDAF - IGVIR - Brigade nationale d'enquêtes vétérinaires et phytosanitaires - Directeurs des Écoles nationales vétérinaires - Directeur assesseur de l'ENSV - Directeur de l'INFOMA - AFSSA -LERQAP

Pour la détection des entérotoxines staphylococciques, il y a lieu de distinguer les méthodes officielles des méthodes utilisables pour les autocontrôles.

Cette note présente d'une part, l'ensemble de la méthodologie préconisée par l'AFSSA-LERQAP en annexe I, et d'autre part, les trousses de détection des entérotoxines utilisables pour les autocontrôles en annexe II.

I) Réglementation applicable

Depuis le 1er janvier 2006, le nouveau règlement sur les critères microbiologiques est entré en vigueur. Ce règlement spécifie que la recherche des staphylocoques à coagulase positive doit être réalisée au stade de fabrication pour lequel le nombre de staphylocoques à coagulase positive est le plus élevé (en général 24 à 48 heures après emprésurage) [1]; par ailleurs, **la recherche des entérotoxines de staphylocoques s'effectuera quand des dénombrements de staphylocoques à coagulase positive (SCP) seront supérieurs à 10^5 ufc/g.**

II) Plan d'échantillonnage et de prélèvement

Les cinq unités 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 l'importance 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, l'on prélèvera les cinq unités de l'échantillon à partir de deux fromages distincts.
  Si le lot est constitué de plus de 500 fromages, l'on prélèvera à partir de trois fromages distincts.

Les 25 grammes nécessaires à la mise en œuvre du mode opératoire décrit en annexe I (6.2, prise d'essai) seront donc constitués à partir des 5 prélèvements (ou unités) d'au moins 25 grammes chacun, prélevés de façon homogène dans l'échantillon et homogénéisés avant la prise d'essai.

Pour les fromages comportant une croûte, il conviendra de veiller à ce que l'échantillon final soumis à analyse comporte 10% de croûte (soit au minimum 12,5 grammes) pour 90% de pâte.

L'analyse de première intention et la confirmation par le Laboratoire National de Référence doivent être réalisées sur le même échantillon. Ainsi, les quantités prélevées devront être suffisantes pour réaliser le dénombrement des staphylocoques à coagulase positive (5 x 10g) , la recherche des entérotoxines staphylococciques (25g) et la confirmation par le LNR (50g), soit un total de 125 g minimum. A défaut, l'analyse de confirmation sera refusée.

[1] Exception faite des 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, ainsi que le lait et le lactosérum en poudre pour lesquels cette recherche est réalisée en fin du procédé de fabrication.

III) Méthodes analytiques

A. Préparation de l'échantillon

Quelle que soit la méthode mise en œuvre, méthodes officielles ou méthodes utilisables pour les autocontrôles, il importe de faire précéder la détection des toxines par une phase de dialyse/concentration adaptée pour pallier le faible rendement d'extraction de toxines.
Cette phase, mise au point par l'AFSSA-LERQAP, figure en annexe I.

B. Méthodes officielles

Pour les contrôles officiels, c'est-à-dire lorsque les entérotoxines sont recherchées dans le cadre d'analyses effectuées à la demande des services officiels de contrôle, deux méthodes de détection au choix peuvent être utilisées après une étape d'extraction par dialyse concentration :

- L'extraction par dialyse/concentration puis la détection par utilisation de la trousse Vidas SET2 (bioMérieux)

ou

- L'extraction par dialyse/concentration puis traitement de l'extrait par immunoglobulines de lapin (Diffchamb) et la détection par utilisation de la trousse Transia Plate Staphylococcal Enterotoxins (Diffchamb).

Les méthodes officielles sont décrites à l'annexe I.

Par ailleurs, l'une ou l'autre des méthodes officielles devra également être utilisée dans le cas où la recherche d'entérotoxines est en relation avec une toxi-infection alimentaire collective susceptible d'être rapportée à la consommation de produits laitiers quel qu'en soit le type et quel que soit le résultat du dénombrement en staphylocoques à coagulase positive.

C. Méthodes utilisables pour les autocontrôles

Leur liste figure en annexe II de la présente note.

IV) Confirmation d'un échantillon trouvé positif en première analyse.

Lorsqu'un échantillon est trouvé positif (c'est à dire lorsque la valeur du test de la méthode officielle est supérieure ou égale au seuil de positivité, quelle que soit la méthodologie de détection utilisée), l'analyse doit faire l'objet d'une confirmation par le Laboratoire National de Référence sur le même échantillon.

De plus, il est demandé aux laboratoires de faire parvenir dans le même colis :

- **5 souches de staphylocoques à coagulase positive en gélose conservation, isolées du lot faisant l'objet d'un dénombrement de SCP supérieur à 10^5 ufc/g, 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.
  Les souches seront envoyées sous triple emballage

- **la fiche de demande d'analyse (annexe III) dûment complétée (recto/verso).**

Remarque : Le verso de la fiche devra être renseigné par la DDSV, le recto par le laboratoire demandant une analyse de confirmation.

V) Contestation des résultats

Il convient de veiller à ce que les modalités suivantes soient respectées lors de toute demande de contre-expertise d'un résultat d'analyses officielles (c'est-à-dire à partir d'échantillons prélevés par un agent officiel et analysés avec une des méthodes officielles rappelées ci-dessus) :

1) La contre-expertise doit être réalisée sur le même lot de produits que celui ayant fait l'objet de l'analyse contestée[2]. A défaut, la demande n'est pas recevable.

2) Le prélèvement doit être effectué sur 5 unités dans ce lot, adressées à l'AFSSA-LERQAP, laboratoire national de référence[3]. Ces 5 prélèvements doivent être effectués par un agent de vos services ou réalisés directement sous son contrôle et non uniquement par le professionnel.

3) Les analyses doivent être facturées au demandeur. Vous devrez vous assurer au préalable que le contestataire s'engage à régler ces frais en lui faisant signer un engagement. A défaut, sa demande n'est pas recevable.

Je vous saurais gré de bien vouloir informer les laboratoires de votre département qui sont chargés des analyses officielles de recherche d'entérotoxines de staphylocoques de cette nouvelle note de service.

Vous voudrez bien me rendre compte des éventuelles difficultés d'application de ces dispositions.

La Directrice Générale Adjointe
C.V.O.

Monique ELOIT

[2] Ceci suppose la conservation, sous la responsabilité du professionnel, du lot concerné afin de pouvoir satisfaire aux conditions de « re-prélèvement » indiquées en V-2.
[3] AFSSA-LERQAP, Pôle HQSA, Unité TOP, équipe TOP BAC, 22, rue Pierre Curie, 94700 Maisons-Alfort

ANNEXE I

Méthodes officielles
Méthodologie de l'AFSSA-LERQAP

1- Objet et domaine.

Le texte décrit une méthode de préparation de l'échantillon, de stockage de l'extrait et de détection pour la recherche des entérotoxines staphylococciques dans les produits laitiers.

2- Principe

- Extraction des entérotoxines staphylococciques
- Concentration de l'extrait par dialyse
- Détection par test immunologique

3- Appareillage

Matériel courant de laboratoire et notamment :

3.1 Mixeur
3.2 Balance analytique
3.3 Matériel d'homogénéisation (ex : ultra-turrax, stomacher…)
3.4 Vortex
3.5 pH mètre
3.6 Bain d'eau
3.7 Centrifugeuse
3.8 Incubateur-agitateur de microplaques
3.9 Enceintes thermostatées ($5 \pm 3°C$; $\leq -18°C$)
3.10 Lecteur de microplaques ou système de lecture Vidas
3.11 Micropipettes
3.12 Tubes à centrifuger
3.13 Tubes à dialyse à seuil de rétention 6000 à 8000 Daltons, largeur à plat 23 ± 2 mm (ex : Spectra/Por, réf : 132 650)
3.14 Pinces à sceller (ex : Spectra/Por, réf : 132 736)
3.15 Vaisselle de laboratoire propre en verre ou en matière plastique

4- Réactifs

4.1 Eau osmosée ou de pureté équivalente
4.2 Acide chlorhydrique 5M et 1M. Pour réaliser une solution de HCl 1M, diluer la solution de HCl 5M au 1/5 (100 mL d'HCl 5M + 400 mL d'eau osmosée), en prenant soin de verser l'acide dans l'eau.
4.3 Hydroxyde de sodium 5M et 1M. Pour réaliser une solution de NaOH 1M, se référer à 4.2
4.4 Tampon PBS (Phosphate Buffer Saline) : $NaCl/Na_2HPO_4$: 145mM/10mM, pH $7,3 \pm 0,2$
4.5 PolyEthylène Glycol 20000 (PEG), qualité pour synthèse
4.6 Kit Transia Plate SET, distribué par Diffchamb (Lyon, France) (référence ST0796),
4.7 Sérum de lapin non immun décomplémenté, distribué par Diffchamb (Lyon, France) (référence AK 0224)
4.8 Kit Vidas SET2, distribué par bioMérieux (Marcy l'Etoile, France) (référence 30 705)

5- Plan d'échantillonnage et de prélèvement

Voir chapitre II du corps de la note

6- Mode opératoire

6.1 Préparation de l'échantillon pour essai

Lorsque cela est possible, mixer et homogénéiser la totalité de l'échantillon à l'aide d'un mixeur (3.1).

6.2 Prise d'essai

Peser 25 g à 0,1g près (3.2) de l'échantillon préalablement mixé (6.1).

6.3 Préparation de l'homogénat

6.3.1 Ajouter 40 mL d'eau osmosée (4.1) à 38 ± 2°C, homogénéiser (3.3).
6.3.2 Récupérer la totalité de l'échantillon en rinçant avec de l'eau osmosée à 38 ± 2°C.
6.3.3 Laisser en contact 30 minutes minimum, à température ambiante et sous agitation (3.6).

6.4 Préparation de l'extrait

6.4.1 Acidifier le broyat à pH 3,5 ± 0,5 à l'aide des solutions préparées en 4.2.
6.4.2 Centrifuger la totalité du broyat à une vitesse minimale de 3130 g, à 4°C, durant 15 minutes (3.7).
6.4.3 Récupérer le surnageant, celui-ci doit être limpide et de pH < 4,5 (dans le cas contraire refaire les étapes 6.4.1 et 6.4.2).
6.4.4 Neutraliser la phase aqueuse à pH 7,3 ± 0,3 à l'aide des solutions préparées en 4.3
6.4.5 Centrifuger de nouveau suivant 6.4.2.
6.4.6 Récupérer la totalité de la phase aqueuse neutralisée.

6.5 Préparation de l'extrait concentré

6.5.1 Préparer une solution de PEG (4.5) à 30%, soit 30 g de PEG dans 100 g qsp d'eau osmosée ou de pureté équivalente pour chaque échantillon.
6.5.2 Couper 50 à 60 cm de tube (3.13) par échantillon.
6.5.3 Mettre à tremper le tube à dialyse 5 minutes dans de l'eau osmosée à 85 ± 5°C.
6.5.4 Rincer les faces externes et internes du tube à l'eau osmosée avant utilisation.
6.5.5 Fermer une des extrémités du tube préparé à l'aide d'une pince à sceller (3.14).
6.5.6 Remplir le tube à dialyse avec la totalité de l'extrait (6.4.6) et fermer avec une deuxième pince. (L'extrait peut être filtré au travers d'un petit coton de verre si de trop nombreuses particules en suspension sont présentes).
6.5.7 Déposer le tube ainsi rempli sur un plateau et le mettre en contact avec la solution de PEG (6.5.1).
6.5.8 Laisser concentrer une nuit environ, à 5 ± 3°C.

NOTE : *Si la concentration n'est pas suffisante, elle peut être poursuivie dans le temps ou en ajoutant du PEG en poudre.*

6.6 Récupération de l'extrait concentré

6.6.1 Rincer les parois extérieures du tube avec de l'eau afin d'éliminer les résidus de PEG.

6.6.2 Récupérer l'extrait concentré en prenant soin de rincer les parois intérieures du tube avec du PBS (4.4) afin d'obtenir un volume final de 5 mL (ou masse voisine de 5 g).

6.7 Stockage de l'extrait concentré

Si la détection ne peut être effectuée dans les 48 h, stocker les extraits à $\leq$ – 18°C, sinon les stocker à 5 $\pm$ 3°C.
Dans le cas d'une congélation des extraits, décongeler les extraits au moment de l'analyse dans un bain d'eau à température ambiante, homogénéiser ces extraits avant de réaliser le test.

7- Détection des entérotoxines : méthodes à mettre en œuvre dans un cadre officiel

L'une ou l'autre des méthodes suivantes doit être utilisée comme décrit ci-dessous :

7.1 Traitement de l'extrait et utilisation de la trousse Transia Plate Staphylococcal Enterotoxins

Avant de tester l'extrait concentré à l'aide de la trousse Transia Plate SET, il est nécessaire de le traiter par ajout de sérum de lapin non immun décomplémenté (4.7) suivant le mode opératoire ci-dessous :
- Prélever 900 µL de l'extrait concentré à tester puis le traiter par ajout de 100 µL de sérum de lapin non immun décomplémenté
- Incuber 1 heure à température ambiante, sous agitation.
- Réaliser le test sur 100 µL d'extrait concentré traité.

7.2 Utilisation de la trousse Vidas SET2

Après extraction par dialyse concentration, réaliser le test Vidas SET2 sur 500 µL d'extrait comme préconisé dans les recommandations du fabricant.

SCHEMA DE PREPARATION DES ECHANTILLONS PRODUITS LAITIERS

25 g + 40 mL d'eau osmosée (38 ± 2 °C)

↓

Homogénéiser

↓

Rincer avec 10 mL d'eau osmosée (38 ± 2 °C)

↓

Laisser diffuser 30 minutes, sous agitation, à température ambiante

↓

Acidifier le broyat à pH 3,5 ± 0,5

↓

Centrifuger la totalité du broyat à une vitesse minimale de 3130 g, à 4°C, durant 15 minutes

↓

Neutraliser la phase aqueuse à pH 7,3 ± 0,3

↓

Centrifuger la totalité de la phase aqueuse neutralisée à une vitesse minimale de 3130 g, à 4°C, durant 15 minutes

↓

Récupérer la phase aqueuse et laisser concentrer par dialyse contre du PEG 20000 pendant une nuit environ, à 5 ± 3°C

↓

Récupérer l'extrait concentré avec du PBS : volume final 5mL (ou masse finale 5 g)

OU

Traitement de l'extrait par immunoglobulines de lapin puis détection par le kit Transia Plate SET :	**Détection par le kit Vidas SET2 :**
- Prélever 900 µL de l'extrait concentré à tester - puis le traiter par ajout de 100 µL de sérum de lapin non immun décomplémenté - Incuber 1 heure à température ambiante sous agitation - Réaliser le test sur 100 µL d'extrait concentré traité.	- Réaliser le test sur 500 µL d'extrait concentré

ANNEXE II

TROUSSES DE DETECTION DES ENTEROTOXINES STAPHYLOCOCCIQUES

utilisables pour les autocontrôles

Fabricant	Nom	Type
BIOMERIEUX	VIDAS SET2	ELFA
DIFFCHAMB	TRANSIA PLATE SET	ELISA
OXOID	SET RPLA	RPLA
R-BIOPHARM	RIDASCREEN SET A,B,C,D,E	EIA

L'attention des utilisateurs des tests mentionnés ci-dessus est attirée sur les points suivants :

- Le kit Oxoïd ne détecte pas l'entérotoxine E

- Pour les kits Oxoïd et R-Biopharm, des déviations positives ont été mises en évidence

- Les limites de détection sont respectivement pour les tests Oxoïd et R-Biopharm de 0,5 et 0,1 ng/mL.

Annexe III

Demande d'analyse « Entérotoxines staphylococciques dans les produits laitiers»

DEMANDEUR	DESTINATAIRE
Tél. : Fax : N/ Réf : N° de dossier : Objet : Date et signature :	**Adresse postale :** Afssa Lerqap Unité TOP, équipe TOP BAC 23 avenue du Général de Gaulle 94706 Maisons Alfort cedex **Adresse de livraison :** Afssa Lerqap Pôle HQSA Unité TOP, équipe TOP BAC 22, rue Pierre Curie 94700 Maisons-Alfort

Remplir une fiche de demande par échantillon à analyser

Type d'échantillon:

❑ **Lait** ❑ **Fromage** ❑ **Autre matrice à base de produit laitier** (préciser……)

Observations particulières :
……

Référence de l'échantillon					
Origine de l'échantillon (département)					
Nombre de SCP/g					
Souches de SCP	Souche 1	Souche 2	Souche 3	Souche 4	Souche 5
Votre référence					
Notre référence (ne pas remplir)					
Résultat entérotoxines staphylococciques par : ❑ Transia plate ❑ Vidas SET2	Valeur brute du test		Seuil de positivité		

Analyse :

Cadre de l'analyse : ❑ **Confirmation** : suite à ❑ contrôle officiel ❑ demande client ❑ TIAC ❑ autre

❑ **Première intention** : suite à ❑ contrôle officiel ❑ demande client ❑ TIAC ❑ autre

Original des résultats à :

Copie des résultats à :

Facturation des résultats à :

Produit laitier :

Référence de l'échantillon	
Nom de l'agent préleveur	
Numéro d'agrément de l'établissement	
Nature du lait de fabrication	❑ Vache ❑ Chèvre ❑ Brebis ❑ Autre (préciser ……)
Lait	❑ Cru ❑ Autre (préciser…….)
Type technologique	❑ pâte pressée non cuite ❑ pâte molle ❑ Autre (préciser…….)
Stade de fabrication lors du prélèvement	❑ 24 heures ❑ 48 heures ❑ 72 heures ❑ Autre (préciser…….)

A remplir lorsque l'aliment est suspecté de toxi infection alimentaire collective :

Nombre de malades / nombre de repas servis	
Symptômes	❑ Nausées ❑ Douleurs abdominales ❑ Vomissements ❑ Diarrhées ❑ Fièvre ❑ Non renseigné
Délai d'apparition des symptômes	

Autres informations :