Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

MINISTERE DE L'ALIMENTATION, DE L'AGRICULTURE ET DE LA PÊCHE

Direction générale de l'alimentation
Service de l'alimentation
Sous-direction de la sécurité sanitaire des aliments
Bureau des zoonoses et de la microbiologie alimentaires

Adresse : 251 rue de Vaugirard
75 732 PARIS CEDEX 15
Suivi par : Laurence Giuliani
Tél : 01.49.55.84.94
Courriel institutionnel : bzma.sdssa.dgal@agriculture.gouv.fr

NOR : AGRG1004364N

Réf. Interne : NS modifiant N2009_8137.doc
MOD10.21 B 29/10/09

NOTE DE SERVICE

DGAL/SDSSA/N2010-8046

Date: 18 février 2010

Date de mise en application :	Immédiate
Modifie :	Note de service DGAL/SDSSA/SDPPST/N2009-8137 du 12 mai 2009
Date limite de réponse :	-
Nombre d'annexe :	1
Degré et période de confidentialité :	Tout public

Objet : Recherche des entérotoxines staphylococciques de type SEA à SEE dans les échantillons autres que les produits laitiers : complément d'information concernant les difficultés analytiques rencontrées avec certaines matrices.

Références :

- Règlement (CE) n178/2002 du Parlement européen et du Conseil du 28 janvier 2002, établissant les principes généraux et les prescriptions générales de la législation alimentaire, instituant l'Autorité européenne de sécurité des aliments et fixant des procédures relatives à la sécurité des denrées alimentaires
http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2002R0178:20080325:FR:PDF ;
- Règlement (CE) n2073/2005 de la Commission du 15 novembre 2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires
http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2005R2073:20071227:FR:PDF ;
- Note de service DGAL/SDSSA/N2008-8009 du 14 janvier 2008, modifiée par la note de service DGAL/SDSSA/N2009-8247 du 25 août 2009 : Précisions relatives aux modalités de mise en œuvre des analyses microbiologiques de denrées alimentaires et d'exploitation des résultats :
http://www.circulaires.gouv.fr/pdf/2009/08/cir_29363.pdf .

Résumé : Cette note de service a pour objectif d'apporter, suite à la demande de l'AFSSA-LERQAP, laboratoire communautaire (LCR) et national (LNR) de référence pour les staphylocoques à coagulase positive, quelques modifications sur la méthodologie à appliquer pour la recherche des entérotoxines staphylococciques dans les denrées alimentaires autres que les produits laitiers. En effet, depuis la publication, le 12 mai 2009, de la note de service DGAL/SDSSA/SDPPST/N2009-8137, des difficultés particulières ont été mises en évidence, en rapport avec la nature de certains échantillons. Lorsque des problèmes analytiques sont rencontrés, il est recommandé au laboratoire concerné de prendre contact avec l'AFSSA-LERQAP afin de déterminer la solution la plus adaptée. Des précisions sont apportées pour les échantillons non analysables et les résultats ininterprétables, en raison de l'impossibilité d'obtenir des résultats fiables avec certaines matrices.

Mots-clés : Produits carnés – Produits à base de poisson – Produits transformés - Méthode d'analyse - Entérotoxines – *Staphylococcus aureus* - TIAC

Destinataires	
Pour exécution : - DRAAF - Directeurs départementaux en charge de la protection des populations	**Pour information** : - Préfets - IGAPS - BNEVP - DGCCRF - DGS / InVS - AFSSA-LERQAP - ADILVA

I - Contexte

La note de service DGAL/SDSSA/SDPPST/N2009-8137, publiée le 12 mars 2009, a mis à jour la méthodologie à appliquer pour la recherche des entérotoxines staphylococciques (ES) dans les denrées alimentaires autres que les produits laitiers (produits à base de viande, produits de la pêche, pâtisseries, etc.). Le mode opératoire analytique est celui préconisé par l'AFSSA-LERQAP[1], laboratoire communautaire (LCR) et national (LNR) de référence pour les staphylocoques à coagulase positive (SCP).

Depuis la publication de la note de service DGAL/SDSSA/SDPPST/N2009-8137, des difficultés analytiques particulières ont été mises en évidence, en rapport avec la nature de certains échantillons.

Cette note de service modificative est destinée à apporter des précisions sur la conduite à tenir face à ce type de situation.

La version consolidée jointe en annexe visualise l'ensemble des modifications apportées à la note de service DGAL/SDSSA/SDPPST/N2009-8137.

II - Principaux points modifiés

A - Difficultés liées à la nature de certains échantillons

Des difficultés opératoires peuvent être rencontrées lors de l'analyse de certaines matrices, notamment les produits carnés crus pour ce qui concerne la phase d'extraction par dialyse-concentration. Il convient dans tous les cas de veiller au strict respect du mode opératoire décrit en annexe I de la note de service DGAL/SDSSA/SDPPST/N2009-8137, une modification même mineure des paramètres de la méthode étant susceptible d'entraîner des résultats erronés.

Lorsque des difficultés analytiques sont observées, il est recommandé au laboratoire concerné de prendre contact avec le LNR SCP-ES (AFSSA-LERQAP) afin de déterminer, de façon concertée, la solution la plus adéquate.

L'échantillon soumis à essai peut alors être non analysable, ou les résultats non interprétables.

B - Echantillons non analysables ou ininterprétables

Lorsque des difficultés opératoires ont été rencontrées par le laboratoire d'application ayant mis en œuvre les différentes étapes analytiques recommandées, le LNR, dans le cadre de sa mission de caractérisation des cas de TIAC[2] à staphylocoques à coagulase positive, sera susceptible d'émettre des réserves d'ordre technique quant à la mise en œuvre de la méthode de détection et à l'obtention de résultats fiables avec certains échantillons.

Les précisions suivantes seront apportées, le cas échéant :

- analyse non réalisée car sans fondement (par exemple cas des matrices crues dans lesquelles les staphylocoques à coagulase positive n'ont pas été dénombrés et/ou des matrices où les staphylocoques à coagulase positive ne sont pas susceptibles de se développer) ; le LNR SCP-ES procédera dans ce cas à un refus d'échantillon (par exemple végétaux crus) ;
- analyse non aboutie, avec émission d'un rapport d'essais accompagné d'un courrier explicitant les motifs ayant conduit à l'arrêt des analyses.

Vous voudrez bien m'informer des éventuelles difficultés rencontrées dans la mise en application de ces nouvelles dispositions.

Le Directeur Général Adjoint
Chef du Service de la Coordination
des Actions Sanitaires – C.V.O.

Jean-Luc ANGOT

[1] LNR pour les staphylocoques à coagulase positive (SCP) - volet entérotoxines (ES)
AFSSA-LERQAP – Unité CAT – Equipe CAT BAC - Pôle HQSA - 22 rue Pierre Curie – 94706 Maisons-Alfort Cedex

[2] toxi-infections alimentaires collectives

ANNEXE

Version consolidée de la note de service DGAL/SDSSA/SDPPST/N2009-8137

Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

ORDRE DE METHODE ~~SERVICE D'ACTION~~

MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PÊCHE

Direction générale de l'alimentation
Adresse : 251 rue de Vaugirard 75 732 PARIS CEDEX 15

Service de l'alimentation
Sous-direction de la sécurité sanitaire des aliments
Bureau des zoonoses et de la microbiologie alimentaires
Suivi par : Laurence Giuliani
Tél : 01.49.55.84.94
Courriel institutionnel : bzma.sdssa.dgal@agriculture.gouv.fr

Service de la coordination des actions sanitaires
Sous-direction du pilotage et des politiques sanitaires transversales
Bureau des laboratoires et de la coordination des contrôles officiels
Suivi par : ~~Estelle Loukiadis /~~ Denis Lucas
Tél : 01.49.55.58.86
Courriel institutionnel : blacco.sdppst.dgal@agriculture.gouv.fr
MOD10.27 A 03/09/08

NOTE DE SERVICE
DGAL/SDSSA/SDPPST/N2009-8137
Date: 12 mai 2009

Date de mise en application :	immédiate
Abroge et remplace :	note de service DGAL/SDSSA/SDRRCC/N2007-8267 du 30 octobre 2007
Date limite de réponse :	~~15 juin 2009~~ aucune
Nombre d'annexes :	2
Degré et période de confidentialité :	~~public ciblé (destinataires)~~ tout public

Objet : Recherche des entérotoxines staphylococciques de type SEA à SEE dans les échantillons autres que produits laitiers.

Références :

- Règlement (CE) n178/2002 du Parlement européen et du Conseil du 28 janvier 2002, établissant les principes généraux et les prescriptions générales de la législation alimentaire, instituant l'Autorité européenne de sécurité des aliments et fixant des procédures relatives à la sécurité des denrées alimentaires.
- Règlement (CE) n2073/2005 de la Commission du 15 novembre 2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires, modifié par le règlement (CE) n1441/2007 de la Commission du 5 décembre 2007.
- Note de service DGAL/SDSSA/N2008-8009 du 14 janvier 2008, modifiée par la note de service DGAL/SDSSA/N2009-8247 du 25 août 2009 : Précisions relatives aux modalités de mise en œuvre des analyses microbiologiques de denrées alimentaires et d'exploitation des résultats.

Résumé : Cette note de service a pour objectif de préciser la méthodologie à appliquer pour la recherche des entérotoxines staphylococciques dans les denrées alimentaires autres que les produits laitiers ~~ne contenant pas de lait~~ (produits à base de viande, produits de la pêche, pâtisseries ~~sans lait~~, etc.). Elle s'adresse à la fois aux différents intervenants participant au choix du plan d'échantillonnage et à la réalisation des prélèvements, qu'il s'agisse de contrôles officiels ou d'autocontrôles, et aux laboratoires d'analyses. Le mode opératoire analytique préconisé par l'AFSSA-LERQAP, laboratoire communautaire (LCR) et national (LNR) de référence pour les staphylocoques à coagulase positive (SCP), est précisé en annexe I, pour les analyses officielles et les autocontrôles. ~~Le DDSV doit informer, d'ici le 15 juin 2009, les laboratoires d'analyses concernés des dispositions de la présente note de service.~~

Mots-clés : Produits carnés – Produits à base de poisson – Produits transformés - Méthode d'analyse - Entérotoxines – *Staphylococcus aureus* - TIAC

Destinataires	
Pour exécution : - DRAAF - Directeurs départementaux en charge de la protection des populations ~~des services vétérinaires~~	**Pour information** : - Préfets ~~- Inspecteurs généraux vétérinaires interrégionaux~~ - IGAPS - Brigade nationale d'enquêtes vétérinaires et phytosanitaires - DGCCRF - DGS / InVS - AFSSA-LERQAP - ADILVA

I - Contexte des demandes d'analyse

Le règlement (CE) n2073/2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires, modifié par le règlement (CE) n1441/2007, ne définit pas de critères staphylocoques à coagulase positive et entérotoxines staphylococciques pour les produits autres que laitiers, à l'exception des produits décortiqués et décoquillés de crustacés et de mollusques cuits pour lesquels il existe un critère d'hygiène des procédés pour les staphylocoques à coagulase positive. Seuls les fromages, laits en poudre et lactosérums en poudre font l'objet de critères réglementaires (critères d'hygiène des procédés pour les staphylocoques à coagulase positive, critères de sécurité pour les entérotoxines).

Il peut néanmoins être fait référence à l'article 14 du règlement (CE) n178/2002, qui précise qu'**aucune denrée alimentaire n'est mise sur le marché si elle est dangereuse**, c'est-à-dire si elle est considérée comme :

- préjudiciable à la santé,
- ou impropre à la consommation humaine.

Dans ce contexte, les analyses de détection des entérotoxines staphylococciques dans des échantillons autres que produits laitiers (produits à base de viande, produits de la pêche, pâtisseries sans lait, etc.) sont, dans la grande majorité des cas, mises en œuvre pour les raisons suivantes :

- suspicion de toxi-infection alimentaire (TIA),
- mise en évidence d'une teneur anormalement élevée en staphylocoques à coagulase positive lors du dénombrement effectué dans le cadre d'un autocontrôle ou d'un contrôle officiel (supérieur à 10^5 ufc/g),
- mise en évidence ou présomption d'une contamination anormale par des staphylocoques à un stade donné de la chaîne alimentaire,
- alerte spécifique en rapport avec un nombre élevé de staphylocoques à coagulase positive ou la présence d'entérotoxines dans un aliment.

II - Recommandations

A - Croissance de *Staphylococcus aureus* et toxinogénèse

D'après les données bibliographiques, la température minimale de croissance de *Staphylococcus aureus* varie en fonction des souches, de 6C à plus de 12C. La température maximale de développement se situe pour sa part entre 39,5C et 48,5C.

La production d'entérotoxines peut se faire entre 10C et 48C, mais la zone de température permettant la toxinogenèse est en réalité beaucoup plus étroite pour certaines souches. *Staphylococcus aureus* est sensible aux acides (pH minimum de croissance égal à 4), mais tolère une activité de l'eau très basse (a_w minimum de 0,83 en aérobiose et 0,90 en anaérobiose).

Les entérotoxines staphylococciques présentent la particularité de résister à la chaleur. Il est difficile de prévoir le comportement d'une entérotoxine staphylococcique vis-à-vis d'un traitement thermique et il est important de tenir compte du type d'entérotoxine, de sa concentration initiale, et de la matrice dans laquelle elle se trouve. Il est en conséquence impossible d'exclure la possibilité de la présence d'entérotoxines dans des échantillons ayant fait l'objet d'un traitement thermique, même dans des conserves après appertisation avec des barèmes de stérilisation élevés. A noter que les entérotoxines staphylococciques sont également résistantes aux rayonnements ionisants et à la congélation.

B - Modalités de mise en œuvre des analyses

- La recherche d'entérotoxines staphylococciques doit être réalisée dans des matrices susceptibles d'avoir permis la croissance de staphylocoques à coagulase positive à un taux de 10^5 ufc/g et la toxinogenèse. Il convient néanmoins de tenir compte du caractère thermostable des entérotoxines. Un traitement thermique postérieur à la toxinogenèse peut en conséquence provoquer la destruction des staphylocoques, et donc aboutir à un résultat inférieur au seuil de détection lors du dénombrement, alors que les entérotoxines ne sont ni dénaturées, ni inactivées, et sont toujours présentes.

- Le dénombrement des staphylocoques à coagulase positive dans les matrices décrites ci-dessus, et dont le procédé de fabrication n'est pas susceptible d'avoir détruit les entérotoxines doit, dans la mesure du possible, être réalisé avant la recherche de toxines. En cas d'isolement de souches, ces dernières devront être conservées en gélose conservation pour un envoi ~~éventuel~~ au laboratoire national de référence (LNR SCP-ES[3]), avec l'échantillon pour analyse, lors de demande de confirmation (cf. annexe II).

- Dans le cas d'épisodes toxiques, il convient par ailleurs de recueillir les données indiquant le nombre de malades par rapport au nombre de personnes exposées, la nature et le délai d'apparition des symptômes, ainsi que des informations sur les quantités de matrice ingérée lorsque cela est disponible. Ces informations devront être communiquées au LNR SCP-ES[1] en cas d'envoi de l'échantillon pour analyse (cf. annexe II).

- Dans le cas des conserves ou de matrices ne contenant pas de staphylocoques à coagulase positive dénombrables, il peut s'avérer utile, en complément de la détection des entérotoxines, de réaliser des observations microscopiques, après coloration de Gram, sur des frottis réalisés suivant la norme NF V08-401 (« Contrôle de la stabilité des produits appertisés et assimilés – Méthode de référence »). Ils peuvent permettre de mettre en évidence la présence de coques Gram positif en grand nombre dans le produit, cette observation pouvant conforter un éventuel résultat positif en entérotoxines.

III - Plan d'échantillonnage et de prélèvement

A - Cas général

Une prise d'essai de 25 g est nécessaire pour effectuer la recherche des entérotoxines staphylococciques. Lors du prélèvement, en fonction de la nature de la matrice, il convient de prendre en compte la réalisation éventuelle du dénombrement des staphylocoques à coagulase positive, ainsi que la nécessité de procéder à une analyse de confirmation par le LNR SCP-ES[1].

En conséquence, la quantité 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),

soit, **au minimum, un total de 85 g pour chaque unité** composant l'échantillon.

Le nombre d'unités composant l'échantillon peut être variable en fonction du contexte à l'origine de la demande d'analyse. Dans le cas de contrôles officiels, il convient d'avoir recours à un **plan d'échantillonnage de type n=5**. Lors des autocontrôles, la détection des entérotoxines staphylococciques est souvent décidée suite à la mise en évidence d'une concentration élevée en staphylocoques à coagulase positive, sur le même échantillon que celui ayant servi au dénombrement, constitué dans la plupart des cas d'une seule unité (n=1).

Dans le cas d'un échantillon composé de plusieurs unités, la recherche des entérotoxines staphylococciques peut être réalisée sur un mélange des différentes unités, selon le niveau de contamination présumé, l'homogénéité du lot et/ou la quantité disponible au moment du prélèvement. Si la prise d'essai est obtenue à partir **d'un mélange de 5 g prélevés dans 5 unités composant l'échantillon**, le plan d'échantillonnage correspond à **n=1**.

Il convient de garder en mémoire que **tout plan d'échantillonnage présente une limite dans sa capacité à détecter une contamination**. Cette limite est d'autant plus forte que le niveau de contamination (concentration) et/ou la fréquence de contamination (unité du lot) sont faibles. Il est néanmoins possible d'estimer la probabilité d'accepter à tort un lot contaminé, en fonction du nombre d'unités analysées, et du taux de contamination supposé du lot. **Cette estimation nécessite d'émettre deux hypothèses : la contamination est homogène et les unités analysées sont représentatives du lot considéré**.

A titre d'exemple, dans le cas d'un plan d'échantillonnage de type n=5 et c=0, soit 5 recherches d'entérotoxines négatives, et pour une hypothèse estimée à 30% d'unités contaminées, la probabilité d'accepter à tort un lot contaminé est égale à 17%. Pour un plan d'échantillonnage de type n=3 et c=0, cette probabilité passe à 34%. Pour n=1, elle atteint 70%.

[3] LNR pour les staphylocoques à coagulase positive (SCP) - volet entérotoxines (ES)
AFSSA-LERQAP – Unité CAT – Equipe CAT BAC - Pôle HQSA - 22 rue Pierre Curie – 94706 Maisons-Alfort Cedex

B - Cas particuliers de TIA à staphylocoques à coagulase positive

Dans le cas particulier d'une **toxi-infection alimentaire**, si la quantité d'échantillon disponible au moment du prélèvement est insuffisante, et si les symptômes observés sont en faveur d'une intoxination staphylococcique (nausées, douleurs abdominales, vomissements violents et répétés, éventuellement accompagnés de diarrhée, généralement sans fièvre), il peut être **procédé directement à la mise en œuvre de la recherche des entérotoxines, sans dénombrement des staphylocoques à coagulase positive**. Le cas échéant, compte tenu de la forte concentration suspectée, la masse de la prise d'essai peut être inférieure à 25 g, avec cependant une masse minimale de prélèvement de 12,5 g (cf. annexe I, remarque point 6.6).

IV - Méthodes d'analyse

A - Préparation de l'échantillon

Quelle que soit la méthode mise en œuvre, officielle ou utilisable pour les autocontrôles, il importe de faire précéder la détection des toxines par une **phase de dialyse/concentration** adaptée afin de pallier le faible rendement d'extraction de toxines.

Cette phase, mise au point par l'AFSSA-LERQAP, est détaillée en annexe I.

B - Mode opératoire

La même méthode doit être utilisée pour les analyses officielles et pour les autocontrôles.

Le mode opératoire détaillé, préconisé par le LNR SCP-ES, figure en annexe I. Il inclut une étape de **pré-traitement de l'extrait par des immunoglobulines de lapin**. En outre, dans le cas de matrices à base de viande ou de poisson, il est nécessaire de **traiter l'extrait obtenu par le kit « viande crue »** distribué par la société BioControl Systems.

La détection des entérotoxines doit être réalisée à l'aide de la **trousse Transia Plate Staphylococcal Enterotoxins**, commercialisée par la société BioControl Systems.

C - Contrôles officiels

Lorsque les entérotoxines sont recherchées sur des échantillons prélevés par les services officiels de contrôle, les **analyses doivent être réalisées dans un laboratoire agréé** par le Ministère de l'agriculture et de la pêche. Les conditions d'agrément et la liste des laboratoires agréés seront publiées par note de service.

D - Difficultés liées à la nature de certains échantillons

Des difficultés opératoires peuvent être rencontrées lors de l'analyse de certaines matrices, notamment les produits carnés crus pour ce qui concerne la phase d'extraction par dialyse-concentration. Il convient dans tous les cas de veiller au strict respect du mode opératoire décrit en annexe I, une modification même mineure des paramètres de la méthode étant susceptible d'entraîner des résultats erronés.

Lorsque des difficultés analytiques sont observées, il est recommandé au laboratoire concerné de prendre contact avec le LNR SCP-ES afin de déterminer, de façon concertée, la solution la plus adéquate.

V - Expression des résultats

A - Cas général

Les résultats négatifs seront exprimés sous la forme « **entérotoxines staphylococciques non détectées dans 25 g** », et les résultats positifs sous la forme « **entérotoxines staphylococciques détectées dans 25 g** », en faisant référence à la présente note de service.

B - Cas particulier

Lorsque des difficultés analytiques liées à la nature de certaines matrices sont rencontrées (cf. section IV-D), l'échantillon peut être considéré comme non analysable, ou les résultats ininterprétables.

VI - Confirmation des résultats ~~positifs~~ par le LNR SCP-ES

A - Echantillons positifs

Lorsqu'un **échantillon est trouvé positif**, **l'analyse doit faire l'objet d'une confirmation par le LNR SCP-ES, sur le même échantillon**.

Il est demandé aux laboratoires ayant réalisé la première analyse de **faire parvenir à l'AFSSA-LERQAP[1], dans le même colis** :

- le(s) échantillon(s) concerné(s) clairement identifié(s) ;
- le cas échéant, 5 souches de staphylocoques à coagulase positive isolées de chaque échantillon (quel que soit le nombre d'unités), en gélose conservation et sous triple emballage ;
- la fiche de demande d'analyse (annexe II) dûment complétée (2 pages ~~recto/verso~~).

B - Echantillons non analysables ou ininterprétables

Lorsque des difficultés opératoires ont été rencontrées par le laboratoire d'application ayant mis en œuvre les différentes étapes analytiques recommandées dans l'annexe I, le LNR, dans le cadre de sa mission de caractérisation des cas de TIAC[4] à staphylocoques à coagulase positive, sera susceptible d'émettre des réserves d'ordre technique quant à la mise en œuvre de la méthode de détection et à l'obtention de résultats fiables avec certains échantillons.

Les précisions suivantes seront apportées, le cas échéant :

- analyse non réalisée car sans fondement (par exemple, cas des matrices crues dans lesquelles les staphylocoques à coagulase positive n'ont pas été dénombrés et/ou des matrices où les staphylocoques à coagulase positive ne sont pas susceptibles de se développer) ; le LNR SCP-ES procédera dans ce cas à un refus d'échantillon (par exemple végétaux crus) ;
- analyse non aboutie, avec émission d'un rapport d'essais accompagné d'un courrier explicitant les motifs ayant conduit à l'arrêt des analyses.

VII - Conduite à tenir

La présence confirmée d'entérotoxines staphylococciques dans un échantillon rend la denrée alimentaire concernée potentiellement **dangereuse au titre de l'article 14 du règlement (CE) n178/2002**. Il convient de prendre contact avec la Mission des urgences sanitaires (MUS) de la DGAL, pour définir les modalités de gestion à mettre en œuvre. En fonction du type et de la quantité d'entérotoxines détectées, des mesures de retrait/rappel des produits pourront être décidées, conformément aux dispositions prévues dans l'article 19 de ce même règlement.

Si les informations disponibles permettent de suspecter fortement la présence d'entérotoxines dans l'aliment, telles, par exemple, l'existence de cas humains à symptomatologie évocatrice d'une intoxination staphylococcique, des résultats d'analyses confirmés positifs sur des aliments produits dans le même établissement ou la mise en évidence associée d'une concentration élevée en staphylocoques à coagulase positive, les mesures de gestion sur le(s) lot(s) concernés peuvent être décidées sans attendre les résultats de la confirmation effectuée par le LNR SCP-ES.

[4] toxi-infections alimentaires collectives

~~Je vous saurais gré de bien vouloir informer, avant le 15 juin 2009, de cette nouvelle note de service les laboratoires de votre département qui réalisent les analyses de recherche d'entérotoxines staphylococciques dans des échantillons autres que produits laitiers.~~

Vous voudrez bien m'informer des éventuelles difficultés rencontrées dans la mise en application de ces dispositions.

Le Directeur Général Adjoint
Chef du Service de la Coordination
des Actions Sanitaires – CVO
Jean Luc ANGOT

ANNEXE I

Recherche des entérotoxines staphylococciques dans les matrices autres que les produits laitiers

Méthodologie AFSSA-LERQAP (LNR/LCR SCP-ES)

1. Objet et domaine d'application

Le texte décrit une méthode de préparation de l'échantillon, de stockage de l'extrait et de détection pour la **recherche des entérotoxines staphylococciques de type SEA à SEE** dans les matrices autres que les produits laitiers (produits à base de viande, produits de la pêche, pâtisseries ~~ne contenant pas de lait~~…).

2. Principe

- Extraction des entérotoxines staphylococciques
- Concentration de l'extrait par dialyse
- Traitement de l'extrait par immunoglobulines de lapin
- Traitement de l'extrait, en fonction du type de matrice, par le kit « viande crue »
- Détection par test immunologique ELISA de type sandwich (Transia Plate SE) des entérotoxines staphylococciques de type A, B, C, D et E.

3. Appareillage et consommables

Matériel courant de laboratoire et notamment :

3.1 Mixeur
3.2 Balance analytique
3.3 Matériel d'homogénéisation (ex : ultra-turrax, stomacher…)
3.4 Système d'agitation à température ambiante (ex : bain d'eau)
3.5 pH mètre
3.6 Centrifugeuse réfrigérée et tubes à centrifuger
3.7 Tubes à dialyse à seuil de rétention 6000 à 8000 Daltons, largeur à plat 23 mm ± 2 mm (ex : Spectra/Por® 1, réf : 132 650, Spectrum)
3.8 Pinces à sceller (ex : Spectra/Por®, réf : 132 736, Spectrum)
3.9 Coton de verre ou papier filtre
3.10 Plateau
3.11 Enceintes thermostatées (5C ± 3C ; ≤ -18C)
3.12 Vortex
3.13 Agitateur (rotatif ou orbital) pour tubes
3.14 Incubateur-agitateur de microplaques
3.15 Lecteur de microplaques
3.16 Micropipettes
3.17 Vaisselle de laboratoire en verre (ou en matière plastique, polypropylène de préférence pour éviter l'adsorption des entérotoxines)

4. Réactifs

4.1 Eau osmosée ou de pureté équivalente
4.2 Hydroxyde de sodium 5M et 1M. Pour réaliser une solution de NaOH 1M, diluer la solution de NaOH 5N au 1/5
4.3 PolyEthylène Glycol 20000 (PEG), qualité pour synthèse

4.4 Sérum de lapin non immun décomplémenté, distribué par la société BioControl Systems, Bellevue, USA (référence AK 0224)

4.5 Kit de traitement « viandes crues », distribué par la société BioControl Systems, Bellevue, USA (référence AK 0220)

4.6 Trousse Transia Plate SE, distribuée par la société BioControl Systems, Bellevue, USA (référence ST0796)

5. Plan d'échantillonnage et de prélèvement

Voir chapitre III du corps de la note.

6. Mode opératoire d'extraction

NOTE : *A chaque étape, veillez à récupérer la totalité de l'échantillon en rinçant si besoin.*

6.1 Préparation de l'échantillon pour essai

Les entérotoxines staphylococciques pouvant être réparties de façon hétérogène dans l'échantillon, 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 25,0 g à 0,1 g près (3.2) de l'échantillon préalablement mixé (6.1).

NOTE : *Pour les produits en poudre, suivre les indications du fabricant ou peser 12,5 g de produit et reconstituer avec 12,5 g d'eau osmosée.*

6.3 Préparation du broyat

6.3.1 Ajouter 40 mL d'eau osmosée (4.1) à 38C ± 2C, homogénéiser (3.3).

6.3.2 Laisser en contact 30 minutes minimum, à température ambiante et sous agitation (3.4).

6.4 Préparation de l'extrait

NOTE : *Pour les matrices contenant des produits laitiers, se référer au paragraphe 6.4 (acidification) de la note de service DGAL/SDSSA/SDPPST/N2009-8136 du 12 mai 2009.*

6.4.1 Neutraliser le broyat à pH 7,3 ± 0,3 (3.5) à l'aide des solutions préparées en 4.2, en veillant à ne pas dépasser pH 9,0, afin de ne pas dénaturer les entérotoxines. Si cela se produit, refaire une prise d'essai et reprendre à partir de 6.2.

6.4.2 Centrifuger la totalité du broyat à une vitesse minimale de 3130 g, à 4C, pendant 15 minutes (3.6).

6.4.3 Récupérer la totalité de la phase aqueuse neutralisée.

6.5 Concentration de l'extrait

6.5.1 Préparer une solution de PEG (4.3) à 30% (p/v), soit 30 g de PEG dans 100 ml d'eau osmosée ou de pureté équivalente pour chaque échantillon.

6.5.2 Couper environ 50 à 60 cm de tube (3.7) par échantillon.

6.5.3 Hydrater le tube à dialyse dans de l'eau osmosée selon les recommandations du fabricant (30 minutes minimum à température ambiante).

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 (3.8).

6.5.6 Remplir le tube à dialyse avec la totalité de l'extrait (6.4.3) et fermer avec une deuxième pince. Afin de limiter le passage de particules en suspension, il est conseillé de filtrer l'extrait au travers de coton de verre ou papier filtre (3.9).

6.5.7 Pour les produits fortement salés ~~et/~~ou sucrés, réaliser deux dialyses d'une heure chacune contre 2 litres d'eau osmosée, sous agitation.

6.5.8 Déposer le tube ainsi rempli sur un plateau (3.10) et le mettre en contact avec la solution de PEG (6.5.1).

6.5.9 Laisser concentrer pendant une nuit environ, à 5C ± 3C (3.11).

NOTE : *Si la concentration de l'extrait 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 avec de l'eau osmosée (4.1) jusqu'à obtenir une masse finale d'extrait comprise entre 5,0 et 5,5 g.

NOTE 1 : *Pour les matrices contenant des produits laitiers, se référer au paragraphe 6.6 (récupération de l'extrait en PBS) de la note de service DGAL/SDSSA/SDPPST/N2009-8136 du 12 mai 2009.*

NOTE 2 : *dans le cas de TIA (Toxi-Infection Alimentaire), la masse de l'échantillon peut être inférieure à 25 g (6.2). La quantité finale de l'extrait concentré (6.6.2) sera alors ramenée à une masse proportionnelle à la masse initiale, afin de conserver un rapport de concentration voisin de 5.*

Lors de cette étape critique, il est recommandé :
- de frotter les parois internes du tube l'une contre l'autre, afin de décoller les entérotoxines des parois
- d'effectuer plusieurs ajouts/vidanges de petits volumes d'eau osmosée ~~de PBS~~, pour récupérer la totalité des entérotoxines.

~~NOTE : *dans le cas de TIA (Toxi-Infection Alimentaire), la masse de l'échantillon peut être inférieure à 25 g (6.2). La quantité finale de l'extrait concentré (6.6.2) sera alors ramenée à une masse proportionnelle à la masse initiale, afin de conserver un rapport de concentration voisin de 5.*~~

6.7 Stockage de l'extrait concentré

Si la détection ne peut être effectuée immédiatement, stocker les extraits à 5C ± 3C, pendant 48h maximum. Au delà, stocker les extraits à ≤ – 18C (3.11).

Dans le cas d'une congélation des extraits, les décongeler ~~les extraits~~ au moment de l'analyse et les homogénéiser ~~ces extraits~~ (3.12) avant de réaliser le(s) traitement(s) et le test Transia Plate SE.

7. Traitement par immunoglobulines de lapin (4.4)

Etant donné que la plupart des trousses de détection basées sur le principe ELISA ont été construites en utilisant des anticorps de capture de souris et des anticorps de révélation de lapin, un pré-traitement utilisant des IgG de lapin pour complexer la protéine A est préconisé afin d'éviter certaines interférences. En effet, certaines protéines telles que la protéine A peuvent se lier au fragment Fc des immunoglobulines G (IgG) de plusieurs espèces animales comme la souris ou le lapin (ce n'est pas le cas des IgG de rat, de mouton et de chèvre).

Avant de tester l'extrait concentré à l'aide de la trousse Transia Plate SE, il est donc nécessaire de le traiter par ajout de sérum de lapin non immun décomplémenté (4.4) suivant le mode opératoire ci-dessous :

- prélever 900 µL de l'extrait concentré à tester puis ajouter 100 µL de sérum de lapin non immun décomplémenté,
- incuber 1 heure à température ambiante sous agitation (3.13).

8. Traitement par kit « viandes crues » (4.5)

Dans le cas de matrices alimentaires contenant des **produits de la mer, produits carnés ou produits de charcuterie**, un traitement supplémentaire est nécessaire sur les extraits concentrés afin d'éliminer d'éventuels faux positifs (cf. cas 1 du ~~schéma de préparation des échantillons~~ mode opératoire simplifié pour la recherche des ES).

9. Détection des entérotoxines : utilisation de la trousse Transia Plate Staphylococcal Enterotoxins (4.6)

Réaliser le test sur 100 µL d'extrait concentré traité par immunoglobulines et éventuellement par le kit « viandes crues » (3.14 et 3.15).

Se reporter à la notice technique du kit Transia Plate SE.

NOTE : *Il est bien connu que la détection immunochimique des entérotoxines staphylococciques présente des inconvénients. Des réactions non spécifiques peuvent être observées avec les trousses commerciales lors de la détection des ES dans certaines matrices alimentaires ou dans des aliments contaminés par d'autres micro-organismes que Staphylococcus spp.*

En plus de molécules telles que la protéine A (voir § 7), d'autres interférences peuvent être liées à la présence d'enzymes endogènes comme la lactoperoxydase. La lactoperoxydase est résistante à pH 3 et son poids moléculaire peut expliquer qu'elle ne soit pas éliminée lors de l'étape d'extraction.

Dans le cas d'un résultat positif obtenu avec la trousse de détection Transia Plate SE et si des interférences dues à la lactoperoxydase endogène sont suspectées, le test suivant peut être réalisé :

1. Placer 100 µL d'extrait concentré traité (voir § 7 et 8) dans un tube et ajouter 50 µL de solution de substrat puis 50 µL de solution de chromogène (solutions fournies dans la trousse de détection Transia Plate SE).

2. Si une coloration bleue-verte apparaît, la lactoperoxydase est présente dans l'extrait concentré.

7. Interprétation des résultats

Un échantillon est considéré comme **positif** si sa valeur d'absorbance est supérieure ou égale au seuil de positivité.

Un échantillon est considéré comme **négatif** si sa valeur d'absorbance est inférieure au seuil de positivité.

Dans le cas où des interférences seraient suspectées (voir § 9), l'échantillon soumis à une analyse dans un cadre officiel devra faire l'objet d'une confirmation par le LNR SCP-ES.

Mode opératoire simplifié pour la recherche d'entérotoxines staphylococciques dans des échantillons autres que produits laitiers

25 ± 0,1 g d'échantillon mixé + 40 mL d'eau osmosée (38C ± 2 C)

↓

Homogénéiser

↓

Laisser diffuser 30 minutes, sous agitation, à température ambiante

↓

Neutraliser le broyat à pH 7,3 ± 0,3 *

↓

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

↓

Récupérer la phase aqueuse et remplir le tube à dialyse

↓

Pour les produits fortement salés ou sucrés :
réaliser 2 dialyses d'une heure contre 2 L d'eau osmosée

↓

Transférer le tube à dialyse dans la solution de PEG 20 000
Laisser concentrer une nuit, à 5C ± 3C

↓

Récupérer l'extrait concentré avec de l'eau osmosée ** :
masse finale comprise entre 5,0 et 5,5 g

↓

Traitement de l'extrait par immunoglobulines de lapin

- Prélever 900 µL de l'extrait concentré à tester
- Ajouter 100 µL de sérum de lapin non immun décomplémenté
- Incuber 1 heure à température ambiante sous agitation.

Cas 1	Cas 2
Dans le cas d'une matrice à base de viande ou de poisson, il est nécessaire de traiter l'extrait obtenu ci-dessus par le kit « viandes crues » (réf. AK 0220). Se reporter à la notice technique du fabricant. - Réaliser le test Transia Plate SE sur 100 µL d'extrait ainsi traité	**Autre matrice que le cas 1** - Réaliser le test Transia Plate SE sur 100 µL d'extrait ainsi traité ~~par immunoglobulines de lapin~~

* : pour les matrices contenant des produits laitiers, acidifier le broyat à pH 3,5 ± 0,5, centrifuger la totalité du broyat à une vitesse minimale de 3130 g, à 4C, pendant 15 minutes avant de neutraliser le surnageant à pH 7,3 ± 0,3

** : pour les matrices contenant des produits laitiers, récupérer l'extrait concentré avec du PBS

ANNEXE II

Demande d'analyse de confirmation « Entérotoxines staphylococciques dans des échantillons autres que produits laitiers »[1]

(Remplir une fiche de demande par échantillon à analyser)

DEMANDEUR	**DESTINATAIRE**
Nom et adresse : Tél. : Fax : N de dossier : Date et signature :	AFSSA-LERQAP Unité CAT, équipe CAT BAC **Adresse de livraison :** Pôle HQSA 22, rue Pierre Curie 94700 Maisons-Alfort **Adresse postale :** 23, avenue du Général de Gaulle 94706 Maisons-Alfort cedex

Lieu de prélèvement : ……

Descriptif de l'échantillon : ❑ Matrice à base de viande ou de poisson ❑ Autre matrice

Préciser (désignation) :……

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

Observations particulières :……

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
Résultat entérotoxines staphylococciques (Kit Transia Plate SE)	N lot Transia Plate SE : …… N lot kit « viande crue », si besoin : …… Seuil de positivité : …… Valeur brute du test : ……				
Réalisation du test d'interférences	❑ oui ❑ non Si oui, quel est le résultat ?.....				
Problème(s) rencontré(s) ou commentaire(s)					

Contexte de l'analyse demandée au LNR :

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

❑ **Alerte :** ❑ non ❑ oui : ❑ **alerte DGAL** ❑ autre **alerte** (préciser le n d'alerte :……)

[1] **Remplir une fiche de demande par échantillon à analyser**

p. 1/2

Demande d'analyse de confirmation « Entérotoxines staphylococciques dans des échantillons autres que produits laitiers » ~~(verso)~~

Envoi des résultats :

❑ **Original des résultats à :** ❑ **Copie des résultats à :**

Facturation des résultats à :

A remplir lorsque l'aliment est suspecté de toxi-infection alimentaire (TIA) **:**

Nombre de malades / nombre de repas servis	
Symptômes	❑ Nausées ❑ Douleurs abdominales ❑ Vomissements ❑ Diarrhées ❑ Fièvre ❑ Autres (préciser) : ❑ Non renseigné
Délai d'apparition des symptômes	
Quantité d'aliment ingérée	

Autres informations :