



Rapport annuel d'activité, année 2023

Laboratoire National de Référence

Staphylocoques à coagulase positive, y compris *Staphylococcus aureus* et entérotoxines staphylococciques

Nom du responsable du LNR

Yacine NIA

Nom du laboratoire où l'activité du LNR est mise en œuvre

Laboratoire de sécurité des aliments -- site de Maisons-Alfort

Nom de l'unité où l'activité du LNR est mise en œuvre

Staphylococcus, Bacillus et Clostridium (SBCL)

Les faits marquants de l'année

- Reprise des sessions de formations NF EN ISO 19020 : après une suspension de la formation portant sur la méthode officielle pour la détection des entérotoxines staphylococciques dans les aliments entre 2020 et 2022 (Covid), le LNR SCP a repris la formation en organisant une session à l'Anses en octobre 2023.
- Fin du projet européen Tox-Detect : le LNR Staphylocoques à coagulase positive (SCP) a coordonné le projet européen TOX-Detect (Development and harmonisation of innovative methods for comprehensive analysis of foodborne toxigenic bacteria, ie. Staphylococci, *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*). Le projet a débuté en 2018, a été financé par le programme One Health EJP et a impliqué l'Institut Pasteur, l'INRAe ainsi que différents partenaires de plusieurs pays européens. Les livrables du projet sont disponibles sur le site OH-EJP (<https://onehealthjep.eu/projects/emerging-threats/jrp-tox-detect>) et sur la plateforme Zenodo (<https://zenodo.org/search?q=tox-detect&l=list&p=1&s=10&sort=bestmatch>) ; voir aussi la publication sur le site de l'Anses (<https://www.anses.fr/fr/content/identifier-bacteries-productrices-toxines>).
- L'unité SBCL s'est engagée dans un projet de thèse co-encadré avec l'Unité Science et Technologie du Lait et de l'œuf de l'INRAe. Ce projet (EntéroStaph) vise à éclaircir les conditions d'expression, production et localisation des entérotoxines émergentes en milieu lait. Pour cela, le transcriptome global de plusieurs souches porteuses des gènes *se* (en particulier, *seq*, *sek*, *sel* et *see*) sera établi par séquençage ARN et des liens entre expression des gènes *se* ciblés, systèmes de régulation de la virulence et voies métaboliques seront investigués. En parallèle, la structure de ces entérotoxines sera déterminée finement par modélisation moléculaire. En conditions de production, la localisation de ces entérotoxines dans le cytoplasme, le surnageant et ou au sein de vésicules extracellulaires sera étudiée. Les résultats attendus permettront de mieux comprendre les conditions de production des entérotoxines émergentes, d'élucider leur mécanisme de libération et ainsi ouvrir des pistes d'amélioration des préparations d'échantillons pour les tests de détection

Abréviations

DDPP : Direction départementale de protection des populations
ES : Entérotoxines staphylococciques
SEA : Entérotoxine staphylococcique de type A
MOT : Micro-Organismes et Toxines hautement pathogènes
SCP : Staphylocoques à coagulase positive
TIAC : Toxi-infection Alimentaire Collective
CEA : Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives
LRUE : Laboratoire de référence de l'Union européenne
NAuRA : Recherche automatique des allèles
ISO : Organisation internationale de normalisation
ELISA : Technique d'immunoabsorption par enzyme liée

1. Méthodes développées ou révisées

Activités relatives au développement de méthodes

Pas de développement méthodologique

Nombre de méthodes développées ou révisées, prêtes à être mises en œuvre

0 méthode(s)

Nombre total de méthodes transférées par le LNR à son réseau dans l'année

0 méthode(s)

2. Matériels biologiques ou chimiques, échantillons et souches d'intérêt

Information disponible auprès du LNR.

3. Activités d'analyse

3.1 Analyses officielles de première intention

Nombre d'analyses officielles de première intention réalisées dans l'année

147 analyse(s)

Détail par type d'analyse de première intention

Analyse des ES selon la norme NF EN ISO 19020 dans le cadre des investigations de TIAC menées par les DDPP d'Ile de France.

Evolution : forte augmentation par rapport aux 5 années précédentes

3.2 Analyses officielles de confirmation

Nombre d'analyses officielles de seconde intention réalisées dans l'année

62 analyse(s)

Détail par type d'analyse de confirmation

- Analyses des ES selon la norme NF EN ISO 19020 pour la confirmation des analyses des laboratoires agréés. Augmentation de nombre d'analyses des entérotoxines : 20. Augmentation du nombre d'analyses par rapport aux années précédentes.
- Caractérisation des souches de SCP : confirmation de la présence de gènes d'entérotoxines par PCR : afin de mieux interpréter les résultats obtenus par les laboratoires agréés par les méthodes immuno-enzymatiques, le LNR met en œuvre (si possible) des méthodes PCR pour la détection de 11 gènes codant pour les ES : 42 Réduction du nombre d'analyses par rapport aux années précédentes

3.3 Autres analyses

Nombre estimé d'autres analyses (non officielles) réalisées dans l'année en lien avec le mandat de LNR

81 analyse(s)

Détail par type d'autres analyses

Ces analyses non officielles représentent une partie importante de l'analyse des entérotoxines par le LNR : confirmation de la présence d'ES dans les aliments dans un cadre d'autocontrôles :

Nombre d'analyses stable par rapport aux années précédentes

3.4 Essais interlaboratoires d'aptitude auxquels le LNR a participé dans l'année

Détail des essais interlaboratoires d'aptitude (EILA) auxquels le LNR a participé dans l'année, dans le cadre : National; UE (en particulier les EILA organisés par le LRUE); International

UE : participation à 1 EILA sur le dénombrement des SCP organisé par le GSC (Gabinete de Servicios para la Calidad – Espagne), 1 EILA sur le dénombrement des SCP organisé par le LGC (RU), 1 EILA sur la détection d'ES organisé par le GSC (Espagne), 1 EILA du LRUE SCP sur la détection d'ES, 1 EILA du LNR allemand (BfR) sur la détection d'ES.

4. Activités de production et de contrôle de matériaux de référence et de réactifs biologiques

Le LNR produit des réactifs à usage du LNR uniquement

Non

Le LNR produit des réactifs à usage du LNR et du réseau

Non

Le LNR produit des matériaux de référence à usage du LNR uniquement

Oui

Types de matériaux de référence produits (MRI, contrôle positif ou négatif, autre)

Production de MRI positifs et négatifs pour mettre en œuvre la méthode spécifique de détection des ES de types SEA à SEE (LSA-INS-0283). Cinq types de MRI positifs sont produits (un par type de toxine : MRI SEA, MRI SEB, MRI SEC, MRI SED et MRI SEE) et un MRI contrôle négatif

Format (sérum, souche, produit chimique, autre) de ces matériaux de référence

Les MRI produits sont sous forme liquide : extrait concentré de lait entier analysé selon la norme NF EN ISO 19020 puis :

- aliquoté et congelé à $\leq -18^{\circ}\text{C}$ dans le cas de MRI négatif ;
- supplémenté par type de toxine (SEA, SEB, SEC, SED ou SEE) puis aliquoté et congelé à $\leq -18^{\circ}\text{C}$;
- l'homogénéité et la stabilité ont été vérifiées.

Nombre de lots produits dans l'année

Pas de production en 2023

Analyse de l'évolution (augmentation, diminution) de l'activité sur les 5 dernières années

Diminution

Le LNR produit des matériaux de référence à usage du LNR et du réseau

Non

Le LNR réalise des contrôles de réactifs commerciaux

Non

5. Activités d'appui scientifique et technique

5.1 Demandes d'appui scientifique et technique (AST) des ministères (de l'agriculture, de la santé ...) ou d'instances européennes ou internationales qui concernent le domaine de compétence du LNR

Nombre de demandes d'AST reçues dans l'année

0 demande(s)

Nombre de rapports d'AST rendus dans l'année, issus de demandes de l'année ou de l'année précédente

0 rapport(s)

5.2 Autres expertises

Les membres de l'équipe du LNR peuvent avoir des activités d'expertise (internes : CES, GT ou externe : EFSA ...) ou des activités auprès de commissions de normalisation (Afnor ...).

Sans objet

5.3 Dossiers de demande d'agrément

Nombre de dossiers de demande d'agrément étudiés dans l'année

0 dossier(s)

5.4 Activités d'appui

Description de ces activités et estimation du temps consacré

Les appels ou e-mails sont adressés au responsable du LNR, à son suppléant ou aux chargés de projets de l'équipe. 3 lignes téléphoniques (directes) et une boîte email générique (LNR-staphylocoques@anses.fr) ont été mises en place pour répondre aux sollicitations des autorités et des professionnels. Quelques sollicitations en 2023 : il s'agit principalement des échanges sur l'analyse des matrices complexes, des analyses non abouties ou des analyses de certains produits bloqués aux frontières entre la France et le Royaume-Uni.

Estimation du temps consacré : environ 40 jours.

6. Animation du réseau de laboratoires agréés ou reconnus

6.1 Description du réseau

Animation d'un réseau de laboratoires agréés

Oui

Nombre de laboratoires agréés dans le réseau

66 laboratoires

Animation d'un réseau de laboratoires reconnus

Non

6.2 Essais interlaboratoires d'aptitude

6.2.1 Organisation d'essais interlaboratoires d'aptitude

Nombre d'EILA organisés par le LNR au cours de l'année

1 EILA

Nom de l'EILA

Détection et dénombrement de *Listeria monocytogenes* (Lm), détection de *Salmonella* spp. et dénombrement des staphylocoques à coagulase positive (SCP) dans les aliments

L'EILA est-il réalisé sous accréditation "17043"?

Non

Nombre de laboratoires participants

66 laboratoire(s)

Nombre de laboratoires agréés participants

66 laboratoire(s) agréé(s)

Le LNR a-t-il participé à l'EILA?

Non

Nombre de laboratoires participants en cours de demande d'agrément

0 laboratoires) en demande d'agrément

Nombre d'autres laboratoires participants

0 laboratoire(s)

Détail des autres laboratoires participants: français/étrangers

0

Nombre de laboratoires dont la performance individuelle a été jugée non satisfaisante par le LNR**

3 laboratoire(s)

Nombre de laboratoires agréés dont la performance individuelle a été jugée non satisfaisante par le LNR**

3 laboratoire(s) agréé(s)

Nature des écarts (limiter aux laboratoires agréés)

Z-score non satisfaisant

Gestion des écarts (limiter aux laboratoires agréés) : actions mises en œuvre pour l'identification des causes et définition des mesures correctives

En cours

Suivi de décisions sur l'agrément

Sans objet

Evolution du réseau dans le temps

Réseau très satisfaisant (réseau suivi pour la thématique dénombrement des SCP), peu d'écarts ont été enregistrés lors des 5 dernières années.

**6.2.2 Exploitation de résultats d'essais interlaboratoires d'aptitude organisé par un tiers
Le LNR exploite les résultats d'EILA organisé(s) par un (des) tiers (LRUE, autre...)**

Non

6.3 Autres actions visant à vérifier l'aptitude des laboratoires

Actions mises en œuvre

Sans objet

6.4 Formation, organisation d'ateliers

Nombre de journées d'échange et de restitution rassemblant les laboratoires agréés du réseau, organisées dans l'année

0 journée(s)

Nombre de sessions de formation des personnels des laboratoires agréés aux méthodes utilisées pour les contrôles officiels, organisées dans l'année

1 session(s) de formation

Détail de ces activités, durée moyenne des sessions et nombre de participants par session

Une session de formation sur la méthode officielle pour la détection des ES dans les aliments (NF EN ISO 19020), 2 jours, 2 participants

Autres formations dans le cadre des activités du LNR

Sans objet

(**) Au sens de la norme 17043

6.5 Organisation d'autres essais interlaboratoires (EIL)

Nombre d'EIL de validation (EILV) organisés par le LNR au cours de l'année

0 EILV

Nombre d'EIL de transfert (EILT) organisés par le LNR au cours de l'année

0 EILT

7. Surveillance, alertes

7.1 Surveillance programmée par l'autorité sanitaire, notamment PS/PC et prophylaxie officielle en santé animale

L'autorité sanitaire a mis en œuvre dans l'année une surveillance programmée dans le champ du LNR

Non

7.2 Autres activités de surveillance

Le LNR est impliqué dans des activités de surveillance autres que celle programmée par l'autorité sanitaire

Non

7.3 Fiches d'alerte ou de signal

Le LNR a émis dans l'année des fiches d'alerte ou de signal dans Salsa (système d'alerte sanitaire de l'Anses)

Non

8. Activités de recherche en lien avec l'activité de référence

| Acronyme | Titre | Statut |
|-----------------|---|----------|
| NRBCe Fiche H20 | Diagnostic rapide de bactéries ou des toxines dans des échantillons biologiques | en cours |
| ESTAPH | Implication des nouvelles entérotoxines staphylococciques dans les Toxi Infection Alimentaires | en cours |
| EnteroStaph | Expression et localisation d'entérotoxines de <i>Staphylococcus aureus</i> nouvellement décrites lors d'une croissance en produit laitier | en cours |

9. Relations avec le CNR

Existence d'un CNR dont le mandat recouvre au moins en partie celui du LNR

Oui

Intitulé du CNR

CNR Staphylocoques

Organisme porteur du CNR

Hospices Civils de Lyon, Groupement Hospitalier Nord - Institut des Agents Infectieux

Rencontre organisée dans l'année avec le CNR

Non

Collaboration avec le CNR dans le cadre de la surveillance

Sans objet

Collaboration avec le CNR dans le cadre de projets de recherche

Sans objet

Autres collaborations avec le CNR, le cas échéant

Sans objet

Transfert de matériel biologique

Non

10. Relations avec le LRUE

Détention d'un mandat LRUE qui recouvre au moins en partie celui du LNR

Oui

Intitulé du mandat de LRUE

Coagulase Positive Staphylococci (including *S. aureus*)

11. Détention d'autres mandats de référence au niveau international

Autres mandats détenus par le LNR dans le même domaine de compétences

Aucun

Liste des publications et communications 2023 dans le cadre du mandat de LNR Staphylocoques à Coagulase Positive

Les noms des auteurs appartenant au LNR sont soulignés. Les publications de cette liste sont sous presse ou publiées.

Communications internationales

- Nia, Y and J. A. Hennekinne. « Tox-Detect: Development and harmonisation of innovative methods for comprehensive analysis of foodborne toxigenic bacteria, ie. Staphylococci, Bacillus cereus and Clostridium perfringens. » One Health EJP Final Meeting 2023, Paris, 11-12 September 2023.
- Hueber, A., J. A. Hennekinne, Y. Nia. « A Multiplex analysis by mass spectrometry: a strong and alternative tool for the detection of staphylococcal enterotoxins involved in food poisoning outbreaks. » 39th Informal Meeting on Mass Spectrometry, Paris, 15-17 May 2023.
- Nia, Y., A. Hueber, A.M. Abdelrahim, A.C. Boitelle, P. Bouchez, L. Bouhier, M. Cavaiuolo, A. Fatihi, F. Guillier, S. Messio, I. Mutel, N. Vingadassalon and J.A. Hennekinne. « What place for mass spectrometry to better elucidate food poisoning outbreaks due to bacterial toxins? » 7th IMEKOFOODS Congress, Maisons-Alfort, 25-27 October 2023.
- Aveilla, N., Y. Nia, F. Becher, A. Fatihi, J.A. Hennekinne, F. Fenaille, S. Simon, C. Feraudet-Tarisse. « Development of monoclonal antibodies for the detection of novel staphylococcal enterotoxins in food » 7th IMEKOFOODS Congress, Maisons-Alfort, 25-27 October 2023.
- Nia, Y., A.M. Abdelrahim, A.C. Boitelle, P. Bouchez, L. Bouhier, M. Cavaiuolo, A. Fatihi, F. Guillier, S. Messio, I. Mutel, N. Vingadassalon and J.A. Hennekinne. « Caractérisation des aliments et des souches impliquées dans des Toxi Infection alimentaires collectives à Staphylocoques » 27th Conference on Food Microbiology. Belgian Society for Food Microbiology (BSFM), Brussels, 12-13 October 2023.