



**Rapport annuel d'activité, année 2022**

**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

## **Les faits marquants de l'année**

1) Le LNR Staphylocoques à coagulase positive (SCP) pilote un groupe de travail au sein du LRUE SCP pour la rédaction d'un guide relatif à l'implication des LNR dans l'investigation des TIAC à staphylocoques. Le LNR a assuré une présentation du travail effectué lors de l'atelier annuel LRUE/LNR SCP (mai 2022) et a animé 2 réunions (visioconférences) en 2022.

2) Le LNR SCP a monté son dossier de demande d'accréditation et a été accrédité par le Cofrac en janvier 2022 pour l'organisation des EILA dédiés à la détection des entérotoxines staphylococciques dans les aliments, selon la norme NF EN ISO 17043. Le premier rapport d'EILA ES sous accréditation a été émis en août 2022.

3) Plusieurs TIAC ont été caractérisées dont deux marquantes :

- TIAC familiale suite à la consommation d'une paella contaminée (Saône-et-Loire) : le LNR a détecté des entérotoxines de type SEA et SEH (SEH nouvelle entérotoxine très peu rapportée dans la littérature).

- Groupe scolaire Louis Blanc (Paris 10ème) : environ 100 élèves malades ont été recensés à l'école maternelle et l'école élémentaire. Le LNR a mis en évidence la contamination de rillettes de poisson par les toxines SEA et SEH. Le séquençage des souches isolées des aliments et de la cuisine (paillasse, mixeur, lavabo) a prouvé que la contamination était due à un défaut d'hygiène en cuisine. L'implication de la toxine SEH (considérée comme nouvelle toxine) a été démontrée en mettant en œuvre des méthodes de pointe développées au sein du LNR (ELISA, WGS, PCR).

4) Les 7-8 décembre 2022 s'est tenu l'atelier bisannuel des LNR *Listeria monocytogenes* et SCP, qui a réuni près de 70 participants.

## **Abréviations**

ES : Entérotoxines staphylococciques

SEA : Entérotoxine staphylococcique de type A

SEH : Entérotoxine staphylococcique de type H

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**

210 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**

78 analyse(s)

##### **Détail par type d'analyse de confirmation**

- Analyse des ES selon la norme NF EN ISO 19020 pour la confirmation des analyses des laboratoires agréés : 7
- Caractérisation des souches de SCP : confirmation de la présence de gènes d'entérotoxines par PCR : afin de mieux interpréter les résultats obtenus 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 : 71

Stabilité sur les 5 dernières années.

#### **3.3 Autres analyses**

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

80 analyse(s)

##### **Détail par type d'autres analyses**

Ces analyses non officielles représentent une partie importante de l'activité du LNR :

Confirmation de la présence d'ES dans les aliments dans un cadre d'autocontrôles : en 2022, 81 échantillons ont été analysés pour une détection d'ES dans le cadre de confirmations d'autocontrôles.

Tendance sur les 5 dernières années : en réduction

#### **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**

- National : 2 EILA sur la détection des ES organisés par le BIPEA
- UE : participation à 1 EILA du LRUE SCP sur la détection d'ES, 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) et 2 EILA sur le typage moléculaire des SCP organisés par le PHE (RU).

### **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 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**

20 aliquots de 0,5 ml et 67 aliquots de 2ml de MRI négatifs ont été préparés (lot SENEG202210).

**Analyse de l'évolution (augmentation, diminution) des tendances en termes d'activité sur les 5 dernières années**

Ces MRI ont été mis en place pour la première fois en 2020. Diminution de production des MRI.

**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.

Peu de sollicitation en 2022, environ 20 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**

2 réseaux :

- Dénombrement de SCP (agrément A, 65 laboratoires)
- Détection des ES (agrément spécifique, 16 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**

Recherche des entérotoxines staphylococciques de type SEA à SEE dans les aliments selon la norme NF EN ISO 19020 : 2017

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

Oui

##### **Nombre de laboratoires participants**

16 laboratoire(s)

##### **Nombre de laboratoires agréés participants**

16 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 laboratoire(s) en demande d'agrément

##### **Nombre d'autres laboratoires participants**

0 laboratoire(s)

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

0 laboratoire(s)

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

0 laboratoire(s) agréé(s)

**Evolution du réseau dans le temps**

Réseau très satisfaisant (réseau suivi pour la thématique ES depuis 2009), 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**

2 journée(s)

**Détail de ces activités et nombre de participants par journée**

Les 7-8 décembre 2022, s'est tenu l'atelier bisannuel des LNR *Listeria monocytogenes* et SCP qui a réuni près de 70 participants (en format mixte visioconférence/présentiel).

Cet atelier a été riche en partage d'informations sur les actualités épidémiologiques, normatives et méthodologiques, grâce aux interventions des collègues de Santé Publique France et des équipes de l'Anses responsables des activités de référence. Les bilans présentés soulignent la stabilité et le très bon niveau d'aptitude des laboratoires à la réalisation des analyses officielles. Les résultats d'études récentes, menées à l'Anses et portant sur des méthodes de typage moléculaire, génétique ou de spectrométrie de masse des souches/toxines soulignent leur intérêt pour la caractérisation des contaminations de la chaîne alimentaire et l'identification des sources de contamination. Cet atelier était également très attendu par les laboratoires agréés dans un contexte de rationalisation des EILA organisés par les LNR Anses et de transition vers une police unique de la sécurité sanitaire des aliments sous l'égide du Ministère de l'agriculture et de la souveraineté alimentaire. La DGAL a rappelé qu'aucun changement n'est à prévoir pour les laboratoires agréés, ni pour les laboratoires du SCL jusque fin 2023 au moins. Jusqu'à cette date, les LNR continueront à inclure les laboratoires du SCL dans les activités destinées aux laboratoires agréés, comme c'est le cas depuis une dizaine d'années.

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

0 session(s) de formation

(\*\*) Au sens de la norme 17043

## Autres formations dans le cadre des activités du LNR

Sans objet

### 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

## 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



## ANNEXES

### Liste des publications et communications 2022 dans le cadre du mandat de LNR Staphylocoques à coagulase positive, y compris *Staphylococcus aureus* et entérotoxines staphylococciques

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

#### Publications scientifiques nationales et internationales ('journal article', classement « RCL »)

Lefebvre, D., K. Blanco-Valle, J. A. Hennekinne, S. Simon, F. Fenaille, F. Becher, and Y. Nia. 2022. "Multiplex Detection of 24 Staphylococcal Enterotoxins in Culture Supernatant Using Liquid Chromatography Coupled to High-Resolution Mass Spectrometry." *Toxins* (Basel) 14 (4): 249. <https://doi.org/10.3390/toxins14040249>.

Lefebvre, D., F. Fenaille, D. Merda, K. Blanco-Valle, C. Feraudet-Tarisse, S. Simon, J. A. Hennekinne, Y. Nia, and F. Becher. 2022. "Top-Down Mass Spectrometry for Trace Level Quantification of Staphylococcal Enterotoxin A Variants." *J Proteome Res* 21 (2): 547-556. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.1c00886>.

Titouche, Y., M. Akkou, K. Houali, F. Auvray, and J. A. Hennekinne. 2022. "Role of milk and milk products in the spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the dairy production chain." *J Food Sci* 87 (9): 3699-3723. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.16259>.

#### Communications nationales ('conference proceedings ou 'conference paper')

##### Présentation orale

Aveilla, N., C. Feraudet-Tarisse, Lefebvre, D., Y. Nia, A. Fatihi, J. A. Hennekinne, F. Fenaille, S. Simon, F. Becher. 2022. « Optimization of Top-down mass spectrometry conditions for the detection of four staphylococcal enterotoxin A variants at the low ng/mL level. » Congrès Analytics, Nantes, 5-8 septembre 2022.

#### Communications internationales ('conference proceedings ou 'conference paper')

##### Présentation orale

Lefebvre, D., K. Blanco-Valle, J. A. Hennekinne, F. Fenaille, S. Simon, F. Becher and Y. Nia. « Multiplex Detection of 24 Staphylococcal Enterotoxins Using Liquid Chromatography Coupled to High Resolution Mass Spectrometry » IAFP European Symposium on Food Safety, Munich, 4-6 mai 2022.

##### Posters

Aveilla, N., C. Feraudet-Tarisse, A. Fatihi, D. Lefebvre, J. A. Hennekinne, F. Fenaille, Y. Nia, F. Becher and S. Simon. « Wide identification of staphylococcal enterotoxins using multiplex mass spectrometry and broad-spectrum antibody capture. » 5eme Conférence International NRBCe, Lille 3-6 mai 2022

Nia, Y., J. A. Hennekinne, J. Masquelier, H. Frentzel, D. Clermont, N. Ramarao, K. Hogeveen, M. Gohar, T. Skjerdal. « TOX-Detect: Development and harmonization of innovative methods for comprehensive analysis of foodborne toxigenic bacteria. ». One Health EJP Joint meeting of Programme Managers Committee and Programme Owners Committee 2022. Stockholm, 21 November 2022