

Département Ressources Biologiques et Environnement
Unité Santé, Génétique et Microbiologie des Mollusques
Laboratoire Santé Environnement et microbiologie

Pascal GARRY

Janvier 2014

ifremer

Synthèse des journées microbiologie sanitaire 2013

Laboratoire Santé Environnement et microbiologie

Laboratoire National de Référence de Microbiologie des coquillages



Synthèse des journées microbiologie sanitaire 2013

Sommaire

1	INTRODUCTION	5
2	LES ACTIVITES DE REFERENCE.....	6
3	LES ACTIVITES DE SURVEILLANCE	6
3.1	Plan de surveillance / plan de contrôle.....	6
3.2	Bilan REMI, études de Zones	7
4	NORMES / REGLEMENTATION	7
4.1	Evolution des normes applicables en microbiologie.....	7
4.2	Critère Codex.....	8
4.3	Protocole gestion norovirus.....	8
4.3.1	Présentation du protocole de gestion norovirus	8
4.3.2	Etude Vironiveau	8
4.3.3	Suivi norovirus Hossegor.....	9
4.4	Bilan TIAC.....	10
4.5	Groupe de travail ANSES, <i>Vibrio parahaemolyticus</i>.....	10
5	ETUDES /RECHERCHE ET DEVELOPPEMENT	10
5.1	Suivi de la contamination des coquillages par <i>Vibrio parahaemolyticus</i> (Pertuis charentais et chenaux du Payré).....	10
5.2	Outil de management environnemental et de gestion de l'avertissement des pollutions microbiologiques du Bassin de Thau (OMEGA THAU).....	11
5.3	Etude de la contamination des coquillages en élevage en rivière d'Auray par les Norovirus (Norocoqauray)	11
5.4	Caractérisation de la contamination microbiologique de l'amont de l'estuaire de la Seudre en période sèche.	12
6	SYNTHESE DES DISCUSSIONS LORS DES PRESENTATIONS.....	12
7	CONCLUSION :	13

Sigles / abréviations

ARS : Agence Régionale de Santé

CIRE : Cellule Inter-Régionale d'Epidémiologie

CLI : Chair et Liquide Intervalvaire

CRC : Comité Régional de Conchyliculture

DDPP : Direction Départementale de la Protection des Populations

DDTM : Direction Départementale des Territoire et de la Mer

DGAI : Direction Générale de l'Alimentation

INVS : Institut National de Veille Sanitaire

LER : Laboratoire Environnement Ressource

LNR : Laboratoire National de Référence

LSEM : Laboratoire Santé Environnement et Microbiologie

PSPC : Plan de Surveillance Plan de Contrôle

RASFF : Rapid Alert System for Food and Feed

TIAC : Toxi-infection Collective

TD : Tissus Digestif

1 Introduction

Les journées de microbiologie sanitaire sont organisées chaque année par le Laboratoire Santé, Environnement et Microbiologie (LSEM). Ces journées permettent de réaliser un bilan des activités liées aux missions de Laboratoire National de Référence Microbiologie des coquillages ainsi que de la surveillance (REMI). Les derniers résultats de la recherche menée au LSEM ou dans les Laboratoires Environnement Ressource (LER) sont également présentés. En 2013, 102 personnes ont participé à ces journées. Y participaient, des représentants de l'administration centrale (DGAL et INVS), de l'administration locale (ARS, DDTM, DDPP, CIRE), des agences de l'eau, des professionnels (CRC) et des laboratoires agréés (Cf Figure 1).

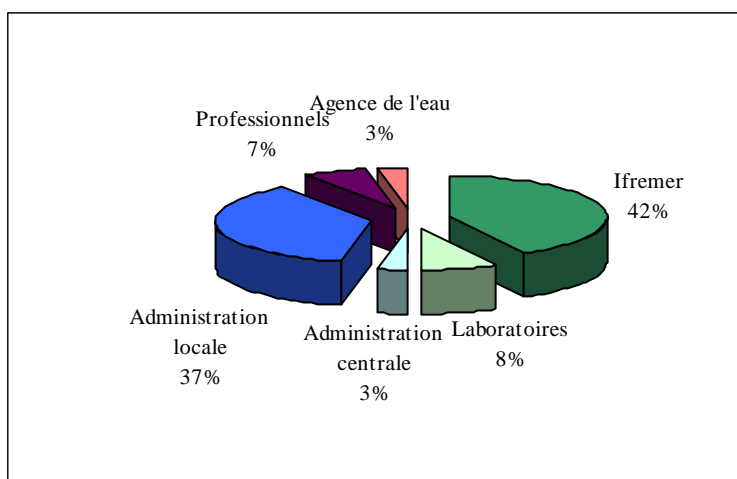


Figure 1 : Origine des participants aux journées microbiologie sanitaire

Les interventions ont été réparties en 4 grandes thématiques :

Activités de référence (Laboratoire National de Référence)

Surveillance

Normes et réglementations

Etudes / Recherche et développement

Ces journées ont été introduites par Soizick Le Guyader, par une présentation de la nouvelle Unité Santé Génétique Microbiologie des Mollusques (SG2M) et du laboratoire Santé Environnement et Microbiologie qui a en charge les activités de LNR microbiologie des coquillages

2 Les activités de Référence

Un bilan des activités 2012 du LNR a été fait. Le LNR a émis 11 avis scientifiques et techniques pour la DGAL (méthodologie, réglementation...). Dans le cadre de TIAC, le LNR a analysé 72 lots de coquillages correspondant à 22 saisines de la DGAL et 8 analyses ont été réalisées dans le cadre d'alertes européennes (RASFF). Au niveau international, le LNR a participé au workshop des LNR en avril 2012 ainsi qu'au 2^{ème} workshop sur la classification et la surveillance des zones de production (comparaison des systèmes européens et américains). Un bilan des essais inter-laboratoires (dénombrement *E. coli* et recherche de *Salmonella* dans les coquillages vivants) a ensuite été présenté. Les résultats obtenus par les laboratoires agréés sont globalement satisfaisants.

3 Les activités de surveillance

3.1 Plan de surveillance / plan de contrôle

La DGAL après avoir rappelé le contexte des plans de surveillance et plans de contrôle (règlement CE n° 854/2004), a présenté le plan de contrôle 2012. Celui-ci portait sur des zones connues pour des non-conformités récurrentes (auto-contrôle, TIAC, PSPC) et sur des établissements s'alimentant en coquillages provenant d'une zone dont le classement n'est pas conforme au Règlement CE n854/2004. 280 prélèvements répartis sur 11 départements ont été réalisés.

Tableau 1 : Résultats du plan de contrôle *E. coli* 2012 sur les coquillages

Espèce de coquillage	Classement de la zone d'origine	Résultats d'analyse < 230 NPP	Résultats d'analyse > 230 NPP	Total
Coque	Zone B	5	2	7
Coquille saint-Jacques	Zone A	12	0	12
Huître creuse	Zone A	74	3	77
	Zone B	79	1	80
Moule	Zone A	13	0	13
	Zone B	64	11	75
Palourde	Zone A	2	0	2
	Zone B	12	2	14
Total Résultat		261	19	280

En 2013, le plan de surveillance en cours concerne 480 prélèvements aléatoires, à la distribution, de coquillages d'origine nationale et non-nationale. Les résultats partiels ont été présentés (cf. Tableau 2). Ce plan sera reconduit en 2014.

Tableau 2 : Résultats partiels du plan de surveillance *E. coli* 2013 sur les coquillages

Espèce de coquillage	Pays d'origine	Résultats d'analyse < 230 NPP	Résultats d'analyse > 230 NPP	Total
Amande	FR FRANCE	22		22
Coque	FR FRANCE	14	1	15
	NL PAYS-BAS	1		1
Coquille St Jacques	GB ROYAUME-UNI	3		3
Huître creuse	FR FRANCE	51		51
Huître plate	FR FRANCE	4		4
Moule	DK DANEMARK	1		1
	ES ESPAGNE	16		16
	FR FRANCE	86	6	92
	GB ROYAUME-UNI	1		1
	IE IRLANDE	4		4
	IT ITALIE	4		4
	NL PAYS-BAS	3		3
Palourde	FR FRANCE	7		7
	PT PORTUGAL	1		1
Telline	FR FRANCE	2		2
Total Résultats		220	7	227

3.2 Bilan REMI, études de Zones

Le bilan REMI concerne actuellement 438 zones classées (106 zones A, 284 zones B, 25 zones C, 9 zones A/B ; 2 zones B/C, 12 zones A ou B provisoires). En 2012, les résultats donnaient 12 zones de bonne qualité, 245 de qualité moyenne, 21 de mauvaise qualité et 13 de très mauvaise qualité. Pour 53 zones, le classement était non conforme à la qualité estimée. En 2012, 277 alertes ont été déclenchées dont 41% d'alertes préventives. Les études sanitaires ont ensuite été présentées. Pour la convention 2011-2012, 17 études étaient prévues et 7 ont été stoppées ou annulées (manque de ressource, mauvaise qualité estimée). Pour la convention 2012-2013 sur les 9 études prévues, 5 sont stoppées ou annulées. Le LER-PC La Tremblade a présenté un exemple d'étude de zone réalisée. Enfin, une présentation sur les produits de diffusion et de valorisation des données de la surveillance littorale, dont le REMI, a été faite.

4 Normes / Réglementation

4.1 Evolution des normes applicables en microbiologie

La norme ISO/TS 15216-1:2013 (Méthode horizontale pour la recherche des virus de l'hépatite A et norovirus dans les aliments par la technique RT-PCR en temps réel) a été présentée de façon détaillée ainsi que les essais en cours au laboratoire pour sa validation. Le laboratoire a dans un premier temps travaillé sur la performance de la méthode (matrice moule) et est également chargé de préparer les moules contaminées pour la validation inter-laboratoire au niveau européen. Des échantillons de moules présentant 4 niveaux de contamination seront envoyés à 10 laboratoires.

L'évolution de la norme expérimentale ISO/TS 21872 Méthode horizontale pour la recherche des *Vibrio spp.* potentiellement entéropathogènes a été présentée en détail. Le laboratoire participe également à la validation européenne de cette méthode, qui est organisée par le Cefas (laboratoire communautaire de référence, LRUE) avec la participation de 17 laboratoires.

4.2 Critère Codex

Une présentation sur l'évolution du critère *E. coli* (mise en place des critères codex) sur les coquillages vivants a ensuite été faite.

Actuellement, dans le cadre du règlement CE 2073/2005, le critère qui s'applique aux coquillages vivants mis sur le marché est défini par un plan à 1 classe avec $n = 1$ et $m = 230$ *E. coli*/ 100 g de CLI. Le critère codex lui est défini par un plan à 3 classes avec $n = 5$ $c=1$ et $m=230$ et $M = 700$.

L'adoption du critère codex a un impact direct sur la surveillance des zones A. La commission européenne devrait adopter une modification du règlement 854/2004, où l'application du critère codex se ferait over time (80% des résultats de surveillance devront être ≤ 230 *E. coli*/100 g de CLI et 20% compris entre 230 et 700).

4.3 Protocole gestion norovirus

4.3.1 Présentation du protocole de gestion norovirus

La DGAL a exposé la note de service DGAL/SDSSA/N2012-8243 sur le protocole cadre de gestion des zones de production de coquillages contaminées par norovirus. Dans le cadre de cette note de service, il est prévu de fermer une zone de production lorsqu'au moins 1TIAC liée à la consommation de coquillages issus de cette zone est avérée. La zone est réouverte après une durée forfaitaire de 28 jours lorsque les signaux d'alerte sont favorables. Durant la fermeture, un suivi de la contamination virale est réalisé sur la zone impliquée.

4.3.2 Etude Vironiveau

En complément de la note de service précédente, cette étude avait pour objectif d'évaluer le niveau de contamination en NoV de zones de production impliquées dans les TIACs. Quatre sites ont été suivis : Ria d'Etel (56), Petite Mer de Gavre (56), les Chenaux du Payré (85) et la lagune de Thau (34). Ces 4 zones sont classées B. La campagne de prélèvement a été réalisée sur 2 hivers 2011/2012 et 2012/2013. Au cours du premier hiver (2011/2012), seuls 10 échantillons positifs sur 121 ont été trouvés. Pour la deuxième période (2012-2013), il a été observé une forte contamination de la Petite Mer de Gâvre et la présence NoV pendant 6 mois pour les chenaux du Payré. Pour les prélèvements provenant de l'étang de Thau, la concentration en norovirus était proche de la limite de quantification.

Les résultats de quantification sont présentés sur la figure 2 pour la période 2012/2013. 63% des échantillons positifs étaient inférieurs à 200 copies/g de Tissus Digestif TD et les 6 échantillons les plus contaminés étaient issus de la « Petite Mer de Gâvre » .

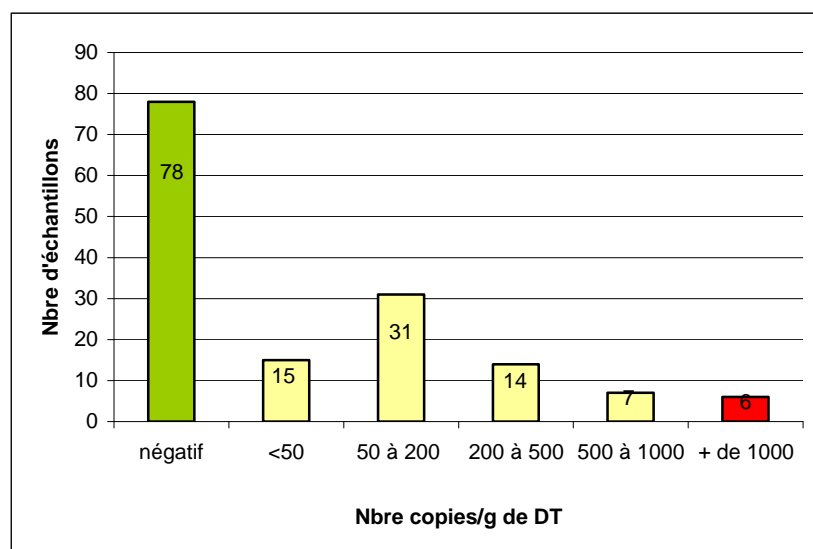


Figure 2 : Concentration en norovirus dans les coquillages (étude 2012/2013)

4.3.3 Suivi norovirus Hossegor

Entre janvier 2011 et juin 2013, 8 foyers de TIAC ont été déclarés suite à la consommation d'huîtres en provenance du lac d'Hossegor. Une présentation des investigations de ces TIACs et des contaminations en norovirus des coquillages a été faite.

Dans le cadre des 3 TIACs déclarées en décembre 2012 et de la fermeture de la zone durant 3 mois, la contamination en norovirus a persisté sur zone durant près de 12 semaines (Figure 3).

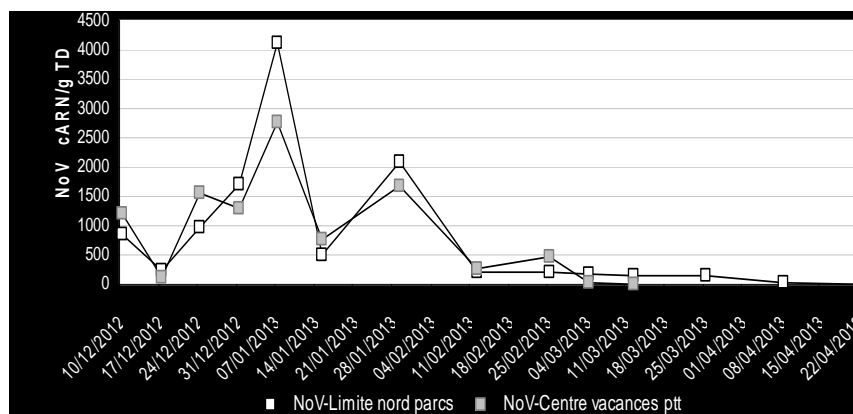


Figure 3 : Contamination en norovirus 12/2012-04/2013

4.4 Bilan TIAC

L'INVS a présenté un bilan des TIACs déclarées et liées à la consommation de coquillages en 2012. Leur nombre était de 92 (sur un total de 1288 soit 7%). Ces TIACs ont été à l'origine de 569 malades. 52% sont survenues en restauration familiale et 40% en restauration commerciale. 24% étaient attribuées à des biotoxines marines, 17% à des virus. Par ailleurs, les erreurs de manipulation lors de la préparation des aliments étaient responsables de 17% de ces TIACs.

4.5 Groupe de travail ANSES, *Vibrio parahaemolyticus*

Les principales conclusions du groupe de l'ANSES « Evaluation du risque lié à *Vibrio parahaemolyticus* lors de la consommation de coquillages vivants » de travail sont :

- La prévalence de vibrions potentiellement pathogènes pour l'homme est globalement faible en Europe, notamment en France et peut être localement plus forte (dépendance aux paramètres environnementaux).

- Les données d'épidémiologie ne mettent pas en évidence l'existence d'un problème de santé publique grave en France (néanmoins l'incidence des gastro-entérites liées aux vibrions est certainement sous estimée) et une enquête paraît nécessaire pour mieux évaluer le risque en France métropolitaine (*V. parahaemolyticus* dans les huîtres et moules).

Une analyse quantitative de risque a été faite montrant un risque accru en été et automne et montrant l'importance de la zone hydrologique. Des recommandations aux professionnels, consommateurs et personnels de santé ont été faites partir de cette analyse de risque. Un point sur les méthodes analytiques a également été présenté

5 Etudes /Recherche et Développement

5.1 Suivi de la contamination des coquillages par *Vibrio parahaemolyticus* (Pertuis charentais et chenaux du Payré)

L'étude environnementale (avril 2008-mars 2011), a montré une saisonnalité pour la prévalence de *V. parahaemolyticus* totaux et entéro-pathogènes dans les moules et l'eau de mer.

Une seconde partie de l'étude était consacrée à l'étude de la prévalence de *Vibrio parahaemolyticus* dans les coquillages dans leur milieu et mis sur le marché (été 2011). Les résultats sont présentés dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Prévalence (%) en *V. parahaemolyticus* totaux (*toxR+*) et entéro-pathogènes (*tdh+* et/ou *trh+*) dans des huîtres et moules prélevées dans le milieu ou mises sur le marché (juillet à octobre 2011)

	Coquillage dans le milieu				Coquillages mis sur le marché			
	Nb éch.	<i>toxR+</i>	<i>tdh+</i>	<i>trh+</i>	Nb éch.	<i>toxR+</i>	<i>tdh+</i>	<i>trh+</i>
Vendée								
Baie de Bourgneuf	7	57,2	0,0	28,8	9	0,0	0,0	0,0
Fromentine	/	/	/	/	5	0,0	0,0	0,0
Chenaux du Payré-Sud Vendée	8	100	0,0	87,5	8	25,0	0,0	12,5
Charente Maritime								
Pertuis Breton-Baie de l'aiguillon	16	68,7	6,25	12,5	4	50,0	0,0	25,0
Marennes Oléron	6	50,0	0,0	33,3	8	12,5	0,0	12,5
Autres	/	/	/	/	2	0,0	0,0	0,0

5.2 Outil de management environnemental et de gestion de l'avertissement des pollutions microbiologiques du Bassin de Thau (OMEGA THAU)

L'objectif du projet est l'élaboration de 2 outils d'aide à la gestion intégrée de l'hydrosystème (bassin versant + lagune) à savoir :

un outil de management environnemental afin de permettre d'orienter et hiérarchiser les travaux sur le bassin versant pour atteindre une qualité microbiologique compatible avec les usages de la lagune

un outil d'avertissement précoce permettant d'avertir les usagers des risques de contamination microbiologique pour permettre une gestion préventive de leur activité (sauvegarde de produits, fermetures préventives de plage, gestion dynamique des réseaux d'assainissement, pilotage du bassin versant au regard des risques)

Une présentation des 2 outils a été faite.

5.3 Etude de la contamination des coquillages en élevage en rivière d'Auray par les Norovirus (Norocoqauray)

Cette étude en cours fait suite à la restructuration d'une station d'épuration (Kerran) avec un rejet à proximité d'une zone conchylicole (rivière d'Auray). Les objectifs de l'étude ont été présentés : il s'agit d'estimer les performances épuratoires de la nouvelle station d'épuration membranaire sur l'abattement des norovirus et des bactéries indicatrices de contamination fécale (*E. coli*), de calculer les flux rejetés dans le milieu, de mesurer l'impact de ces flux sur la contamination (*E. coli* et norovirus) des zones conchylicoles situées en aval, ainsi que leur

importance relative par rapport aux autres apports locaux (ruisseaux, rejets pluviaux). Les résultats sont en cours d'acquisition.

5.4 Caractérisation de la contamination microbiologique de l'amont de l'estuaire de la Seudre en période sèche.

Suite à la dégradation de la qualité microbiologique de l'estuaire de la Seudre, cette étude a été menée afin d'apporter des éléments de diagnostic dans un souci d'amélioration de la qualité microbiologique de l'estuaire. L'étude a montré 2 périodes distinctes de flux de contamination, la période d'étiage étant la période présentant la forte contamination (l'arrêt d'un apport d'eau douce entraînerait une diminution du renouvellement des masses d'eau). Des indicateurs de risque de contamination ont été utilisés afin d'établir un classement des communes du bassin versant : 3 indicateurs de risque de contamination par commune (densité de population (hab./km²) : pression humaine, densité touristique (cap. accueil/km²) : pression humaine en période touristique, et pression animale (éq.hab./km²) : risque de contamination d'origine animale) et 1 indicateur de risque de transfert de la contamination (taux d'artificialisation des sols).

6 Synthèse des discussions lors des présentations

A la fin de chacune des présentations un temps de discussion était possible. Les principales questions posées ainsi que les réponses apportées sont présentées ci-après.

Sur quelle base est prononcé un avis défavorable aux EIL ?

- Celui-ci est formulé sur la comparaison des résultats de l'évolution inter-annuelle.

Quelle(s) suite(s) à l'abandon du critère réglementaire *Salmonella* ?

Si ce critère de sécurité est abandonné, il sera toujours présent en tant que critère hygiène, d'où l'intérêt de poursuivre des EIL sur ce paramètre.

Suite donnée à des résultats non conformes lors du PSPC ?

Des investigations sont menées au niveau des établissements et de la zone de production concernée. Les données obtenues au niveau de l'Etablissement ne sont pas publiées contrairement à celles obtenues sur la zone.

Problématique des résultats *E.coli* selon la méthode d'analyse et la droite d'étalonnage impédancemétrie utilisée sur les échantillons de coquillages prélevés en Normandie ?

La méthode impédancemétrie a été validée par rapport à la méthode NPP selon la norme ISO 16140. Elle a été validée par l'UE après des essais inter laboratoire au niveau européen et a obtenu un avis favorable du LRUE-Cefas. Le LNR a formulé divers avis sur ce sujet à la DGAI suite à ces interrogations régionales. L'incertitude de mesure de la méthode NPP est de 0,5 log et 0,2 log pour l'impédancemétrie.

Quel délai pour la mise à disposition des données de la surveillance ?

Les données de la surveillance sont saisies et qualifiées par les LERs. Aujourd'hui ces données ne peuvent être mises en temps réel en accès Web. Des rapports annuels sont publiés chaque année par les LERs.

Quelle est l'origine des norovirus recherchés dans les coquillages impliqués dans les toxi-infections alimentaires collectives ?

Les norovirus GI et GII sont exclusivement d'origine humaine. Il existe des NoV d'origine animale mais qui correspondent à d'autres génogroupes, non recherchés lors des Tiacs.

Sur les déclarations de Tiacs, il a été confirmé par l'InVS que celles-ci sont nettement sous-déclarées, environ 10/15 % de déclarations. Cette sous-déclaration est principalement due au caractère peu invasif des symptômes et à leur apparition jusqu'à 48 h après les repas pour l'agent norovirus.

La rapidité des investigations menées lors des Tiacs a été soulevée. Selon les retours liés à la déclaration et à la validation de l'implication des coquillages, les délais selon les sites peuvent être plus ou moins longs. Ceci pose une réelle difficulté pour analyser les lots de coquillages impliqués.

Les difficultés d'obtention d'une traçabilité fiable des coquillages a été plusieurs fois évoquée au cours des débats.

7 conclusion :

Ces journées ont permis d'échanger entre les différents acteurs de la filière conchylicole (producteurs, laboratoires et administration). L'enquête de satisfaction réalisée à l'issue de ces journées a montrés que les participants étaient globalement satisfaits. Quelques points d'amélioration ont été suggérés e pourront être pris en compte pour les prochaines journées.