

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

Pascal GARRY

Janvier 2015

**ifremer**

# Synthèse de la journée microbiologie sanitaire 2014

Laboratoire Santé Environnement et Microbiologie

Laboratoire National de Référence de Microbiologie des coquillages





## Sommaire

<b>1</b>	<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>5</b>
<b>2</b>	<b>LES ACTIVITES DE REFERENCE.....</b>	<b>6</b>
<b>3</b>	<b>LES ACTIVITES DE SURVEILLANCE .....</b>	<b>6</b>
<b>3.1</b>	<b>Bilan REMI, études de Zones .....</b>	<b>6</b>
<b>3.2</b>	<b>Plan de surveillance / plan de contrôle.....</b>	<b>6</b>
<b>4</b>	<b>NORMES / REGLEMENTATION .....</b>	<b>7</b>
<b>4.1</b>	<b>Evolution des normes applicables en microbiologie.....</b>	<b>7</b>
<b>4.2</b>	<b>Actualité réglementaire.....</b>	<b>8</b>
<b>4.3</b>	<b>Surveillance des coquillages du groupe 1 .....</b>	<b>9</b>
<b>5</b>	<b>ETUDES /RECHERCHE ET DEVELOPPEMENT .....</b>	<b>9</b>
<b>5.1</b>	<b>Guide méthodologique "Réduction des pollutions bactériologiques sur les bassins versants littoraux" .....</b>	<b>9</b>
<b>5.2</b>	<b>Profil conchylicole de la zone de production de Blainville.....</b>	<b>9</b>
<b>5.3</b>	<b>Rôle de la Cire Ouest dans l'investigation des signalements de pathologies en rapport avec des consommations de coquillages.....</b>	<b>10</b>
<b>5.4</b>	<b>Etude de la contamination des coquillages en élevage en rivière d'Auray par les norovirus (NoroCoqAuray).....</b>	<b>10</b>
<b>5.5</b>	<b>Comparaison de méthodes analytiques pour le dénombrement de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> totaux et entéropathogènes dans les coquillages....</b>	<b>10</b>
<b>5.6</b>	<b>Projet RiskManche.....</b>	<b>11</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSION : .....</b>	<b>11</b>

## 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 Territoires 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

LRUE : Laboratoire de Référence de l'Union Européenne

LSEM : Laboratoire Santé Environnement et Microbiologie

NPP : Nombre le Plus Probable

PSPC : Plan de Surveillance Plan de Contrôle

RASFF : Rapid Alert System for Food and Feed

REMI : Réseau Microbiologique

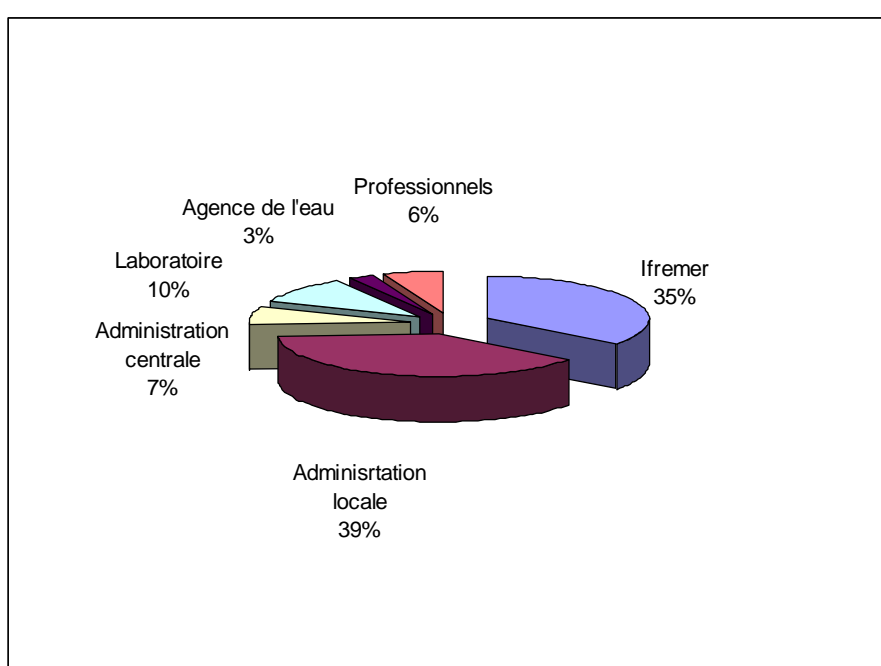
RT pcr : Reverse transcription polymerase chain reaction

STEC : Shiga Toxine *Escherichia coli* (*Escherichia coli* producteur de Shiga toxine)

TIAC : Toxi-Infection Alimentaire Collective

# 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, dans les Laboratoires Environnement Ressource (LER) ou dans d'autres structures ayant des activités en lien avec la sécurité sanitaire des coquillages sont également présentés. En 2014, 116 personnes ont participé à ces journées. Y participaient, des représentants de l'administration centrale (DGAI), 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
- Réglementations
- Etudes

Cette journée a été introduite par Benoît Beliaeff, directeur du département Ressource Biologique et Environnement (RBE).

## 2 Les activités de Référence

Dans le cadre des Toxi-infections Alimentaires Collectives (TIAC), le LNR a analysé en 2013, 171 lots de coquillages correspondant à 38 saisines de la DGAI et 12 analyses ont été réalisées dans le cadre d'alertes européennes (RASFF). Au niveau international, le LNR a participé au workshop des LNR en mai 2013. Un bilan des essais inter-laboratoires (dénombrement d'*E. coli* et recherche de *Salmonella* dans les coquillages vivants) a ensuite été présenté. Les résultats obtenus par les laboratoires agréés sont globalement satisfaisants. Dans le cadre de ses missions d'assistance à l'administration, le LNR a participé à différentes réunions (Plan de surveillance/plan de contrôle, groupe de travail norovirus) et émis différents avis.

## 3 Les activités de surveillance

### 3.1 Bilan REMI, études de Zones

Un bilan des activités 2013 de la surveillance microbiologique des zones de production conchylicole (REMI) a été présenté.

Le REMI concerne actuellement 438 zones classées et surveillées (108 zones A, 288 zones B, 17 zones C, 9 zones A/B ; 5 zones B/C, 11 zones A ou B provisoires). En 2013, 4202 analyses *E. coli* ont été réalisées (3735 en surveillance régulière et 467 en alerte). Depuis une dizaine d'années, le nombre d'alertes est en continuelle augmentation (par exemple : 86 alertes en 2003, et 315 alertes en 2013). Ceci est en partie lié à l'augmentation des alertes préventives de niveau 0 (environ 41% des alertes déclenchées en 2013).

En ce qui concerne la qualité microbiologique estimée des zones, les résultats obtenus donnaient 15 zones de bonne qualité, 250 de qualité moyenne, 34 de mauvaise qualité et 11 de très mauvaise qualité. 208 classements étaient ainsi concordants avec la qualité estimée alors que 79 classements étaient non-concordants. Enfin, 12 zones ont vu leur qualité estimée s'améliorer et 23 se détériorer.

Pour la convention « étude » 2012-2013, neuf études de zone étaient prévues mais cinq ont été arrêtées ou annulées pour les motifs suivants : manque de ressource, mauvaise qualité estimée, zone incluse dans une réserve naturelle. Pour la convention 2013-2014, sur les six études de zone prévues, une a d'ors et déjà été annulée.

### 3.2 Plan de surveillance / plan de contrôle

La DGAI a présenté le plan de surveillance 2013, sur *E. coli*. Il portait sur 474 prélèvements de coquillages au stade de la remise finale au consommateur. Ces prélèvements étaient répartis aléatoirement sur toute l'année et sur tout le territoire national (environ 5 prélèvements par département métropolitain). Les résultats sont présentés dans le tableau 1.

**Tableau 1 : Résultats du plan de surveillance *E. coli* 2013 sur les coquillages**

Espèce	Conforme	Non-conforme	Total
Moule ( <i>Mytila spp</i> , <i>Mytilus spp.</i> , etc.)	220	12	232
Huître creuse ( <i>Crassostrea spp</i> )	117	3	120
Amande ( <i>Glycymeris spp</i> )	39	0	39
Coque ( <i>Cerastoderma spp</i> )	31	4	35
Palourde ( <i>Ruditapes spp</i> ou <i>Venerupis spp</i> )	16	0	16
Huître plate ( <i>Ostrea edulis</i> )	8	1	9
Telline ( <i>Tellina spp</i> )	4	0	4
Couteau ( <i>Solen spp</i> )	2	0	2
Praire ( <i>Venus verrucosa</i> )	1	0	1
Autres espèces de coquillages	16	0	16
<b>Total</b>	<b>454</b>	<b>20</b>	<b>474</b>

Les non conformités (> 230 *E. coli*/100g de CLI), au nombre de 20, représentent 4,2 % des lots analysés. Sur ces 20 non conformités, deux portaient sur des moules espagnoles.

En 2014, un plan de surveillance équivalent est en cours et concerne 480 prélèvements de coquillages d'origine nationale et non-nationale, à la distribution. Les résultats partiels présentés indiquent une non conformité pour 6% des lots analysés.

Pour 2015, le plan de surveillance devrait porter sur 1000 échantillons sur lesquels seront réalisés en parallèle du dénombrement d'*E. coli*, la recherche de norovirus. Afin de réaliser ce plan de surveillance, un réseau de cinq laboratoires agréés pour la recherche des norovirus est en cours de constitution.

## 4 Normes / Réglementation

### 4.1 Evolution des normes applicables en microbiologie

Le laboratoire est membre de la Commission Afnor V08B et de différents groupes de travail, ainsi que ceux du CEN. A ce titre, il participe aux groupes de travail « Statistiques - Incertitudes de mesure », validation de méthode. Il participe également aux travaux du CEN/TC 275 WG 6 TAG3 « Recherche des *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* et *Vibrio vulnificus* dans les aliments » et CEN/TC 275 WG 6 TAG4 "Les virus dans les aliments" : norovirus et VHA.

Différentes normes sont parues en 2013 :

- ISO/TS 15216-1 : Méthode horizontale pour la recherche des virus de l'hépatite A et norovirus dans les aliments par la technique RT-PCR en temps réel - Partie 1: Méthode de quantification
- ISO/TS 15216-2 : Méthode horizontale pour la recherche des virus de l'hépatite A et norovirus dans les aliments par la technique RT-PCR en temps réel - Partie 1: Méthode de détection qualitative
- ISO 7218 Adm 1 Microbiologie des aliments - Exigences générales et recommandations

- ISO 6579 divisée en 3 parties : partie 1: Méthode horizontale pour la recherche des *Salmonella* spp. ; partie 2 : Dénombrement par une technique miniaturisée du nombre le plus probable (2012) ; partie 3 : Lignes directrices pour le sérotypage des *Salmonella* spp. (2014)

La série des normes ISO 6887 est en cours de révision. Les modifications apportées à la norme 6887-3 portent sur différents points dont les prélèvements sur zone (qui ne figuraient pas dans la version précédente), les températures de transport (< 10°C si la durée de transport est supérieure à 4h00) et le nombre d'individus à broyer (10 minimum).

Le laboratoire participe également à la validation européenne de la norme expérimentale ISO/TS 21872 Méthode horizontale pour la recherche des *Vibrio* spp. potentiellement entéropathogènes, Cette validation est organisée par le Cefas (Laboratoire de Référence de l'Union Européenne, LRUE) avec la participation de 17 laboratoires. Les principales évolutions de cette norme sont les suivantes : réalisation de PCR sur les bouillons d'enrichissement à 6h et 18h et identification des souches présomptives.

Le laboratoire a également participé à la validation européenne de la méthode horizontale pour la recherche des virus de l'hépatite A et norovirus dans les aliments par la technique RT-PCR en temps réel- Partie 1- méthode quantitative (ISO TS 15216-1). Le laboratoire a dans un premier temps travaillé sur la performance de la méthode pour la matrice moule. Dans un second temps, des contaminations artificielles de moules à quatre niveaux ont été réalisées et transmises à dix laboratoires pour une validation inter-laboratoires au niveau européen. Ces travaux ont été présentés lors de cette journée.

## 4.2 Actualité réglementaire

La DGAI a présenté les arrêtés ministériels du 6 novembre 2013.

- l'arrêté concernant le classement, surveillance et gestion de zone de production qui abroge l'arrêté du 21 mai 1999<sup>1</sup>,
- l'arrêté concernant les conditions de transfert et de traçabilité des coquillages vivants qui abroge l'arrêté ministériel du 28 février 2000<sup>2</sup>,
- l'arrêté concernant la taille maximale des juvéniles (en zone C), captage ou récolte de naissain en zone non classée qui abroge l'arrêté ministériel du 13 mars 1997<sup>3</sup>.

La DGAI a par ailleurs présenté différentes notes de service :

- NS 2013-8187 : Protocole cadre de gestion norovirus
- NS 2014-487 : Produits de la pêche et les coquillages contaminés par des *Vibrio*
- NS 2013-8154 : Prise en compte des autocontrôles
- NS 2013-8166 : Mesures de gestion lors d'alertes bactériologiques

<sup>1</sup> Arrêté du 6 novembre 2013 relatif au classement, à la surveillance et à la gestion sanitaire des zones de production et des zones de reparcage de coquillages vivants JORF n°0277 du 29 novembre 2013 page 19392

<sup>2</sup> Arrêté du 6 novembre 2013 fixant les conditions sanitaires de transfert et de traçabilité des coquillages vivants JORF n°0277 du 29 novembre 2013 page 19394

<sup>3</sup> Arrêté du 6 novembre 2013 fixant les tailles maximales des coquillages juvéniles récoltés en zone C et les conditions de captage et de récolte du naissain en dehors des zones classées JORF n°0277 du 29 novembre 2013 page 19395



Une présentation a également été faite sur le classement des zones de production et la prise en compte des critères Codex dans l'évaluation des zones A.

### **4.3 Surveillance des coquillages du groupe 1**

Les prescriptions sanitaires des règlements européens 853/2004 et 854/2004 relatives aux mollusques bivalves vivants (classement, surveillance et mesures de gestion) s'appliquent aux coquillages du groupe 1 (tuniciers, échinodermes et gastéropodes marins vivants) à l'exception des gastéropodes non-filtreurs. Les rares études menées montrent que ces espèces sont vulnérables aux apports microbiologiques et chimiques, et sont donc susceptibles de se contaminer. En conclusion, la DGAI a indiqué que des études complémentaires sont nécessaires pour comprendre ces phénomènes de contamination et vérifier la contamination sur d'autres espèces. Dans ce cas, il pourrait être nécessaire de mettre en place un suivi sanitaire de ces espèces.

## **5 Etudes /Recherche et Développement**

### **5.1 Guide méthodologique "Réduction des pollutions bactériologiques sur les bassins versants littoraux"**

L'agence de l'eau Loire Bretagne a présenté le guide méthodologique "Réduction des pollutions bactériologiques sur les bassins versants littoraux" et la démarche qui a permis la rédaction de ce guide.

En résumé, la méthodologie préconisée par ce guide se décompose en trois étapes :

- Pré-diagnostic de la vulnérabilité de la zone conchylicole
- Etude maritime des flux de pollution
- Etude détaillée du bassin versant

Des études ou campagnes de mesures complémentaires peuvent être réalisées, l'ensemble conduisant à la construction d'un plan d'actions hiérarchisées devant permettre de réduire les pollutions bactériologiques.

Le guide peut être téléchargé sur le site de l'agence :

[www.eau-loire-bretagne.fr/espace\\_documentaire/documents\\_en\\_ligne/guides\\_littoral/guide\\_profilsconchyl.pdf](http://www.eau-loire-bretagne.fr/espace_documentaire/documents_en_ligne/guides_littoral/guide_profilsconchyl.pdf)

### **5.2 Profil conchylicole de la zone de production de Blainville**

Après avoir rappelé le contexte réglementaire, l'ARS Normandie a présenté au travers de l'exemple de la zone de production « Blainville-Gouville », la démarche d'élaboration des profils de vulnérabilité des zones de production de bivalves filtreurs et de leurs objectifs. Il s'agit dans un premier temps de dresser l'inventaire des sources de pollution d'origine humaine ou animale susceptibles de constituer une source de contamination des zones de production, puis d'évaluer l'impact des flux de pollution émis au niveau des principaux rejets côtiers. Ces deux premières phases permettent de définir les actions à mettre en œuvre pour

supprimer ou réduire ces sources de pollution. L'outil de modélisation permettant de bien identifier l'impact de chaque apport respectif.

### **5.3 Rôle de la Cire Ouest dans l'investigation des signalements de pathologies en rapport avec des consommations de coquillages**

L'intervention s'est déroulée en deux parties. La première a permis de rappeler l'organisation régionale de la veille sanitaire. Celle-ci est partagée entre l'Institut de Veille Sanitaire (InVS) et les Agences Régionales de Santé (ARS). La deuxième partie était consacrée à la présentation de deux exemples d'investigations d'épidémies attribuées à la consommation de coquillages :

- Epidémie d'hépatite A attribuée à la consommation d'huîtres de la baie de Paimpol, 2007
- Foyers de toxi-infections alimentaires collectives liés à la consommation de coquillages en Loire-Atlantique, 2010

### **5.4 Etude de la contamination des coquillages en élevage en rivière d'Auray par les norovirus (NoroCoqAuray)**

Cette étude fait suite à la restructuration d'une station d'épuration (Kerran) avec un rejet au cœur d'une zone conchylicole (rivière d'Auray). Les objectifs de l'étude ont été présentés : estimer les performances épuratoires de la nouvelle station d'épuration membranaire sur l'abattement des norovirus, et mesurer l'impact de ces flux sur la contamination des zones conchylicoles situées en aval, ainsi que leur importance relative par rapport aux autres apports locaux (ruisseaux, rejets pluviaux).

Les résultats obtenus montrent que les performances de la nouvelle station sont très satisfaisantes, permettant de limiter les apports de norovirus dans le milieu au cours de la période d'épidémie hivernale de gastro-entérite aiguë dans la population. Concernant les coquillages, cette étude a permis de confirmer que sur cette zone, les apports en norovirus sont multiples et contribuent à une contamination générale du milieu. La mise en place de cette nouvelle filière de traitement des eaux usées par rapport à l'ancien traitement, a permis de réduire les apports en norovirus de cet émissaire. Ceci démontre l'intérêt de poursuivre la même démarche de réduction sur les autres points d'entrée des norovirus sur cette zone d'élevage.

### **5.5 Comparaison de méthodes analytiques pour le dénombrement de *Vibrio paraheamolyticus* totaux et entéropathogènes dans les coquillages**

Cette étude propose une comparaison de deux méthodes de dénombrement de *Vibrio paraheamolyticus* totaux et entéropathogènes dans les mollusques bivalves vivants (NPP-PCR en temps réel sur plaques 96 puits développée au laboratoire par rapport à la méthode d'analyse NPP-PCR en tubes, méthode FDA-BAM). La comparaison a été effectuée par le

LSEM en partenariat avec l'ANSES Boulogne. Les résultats ont permis de montrer l'intérêt de la méthode « microplaque-NPP ». Cette méthode permet de réduire l'incertitude sur les résultats par rapport à la méthode « tubes-NPP ». Quelques améliorations restent à apporter à la méthode « microplaque-NPP » afin de réduire l'inhibition observée pour les 1<sup>ères</sup> dilutions.

## 5.6 Projet RiskManche

Il s'agit d'un Programme Interreg IVA France (Manche)/Angleterre (FEDER). L'objectif de ce projet est d'acquérir des connaissances sur la présence, la diversité et l'origine de microorganismes potentiellement pathogènes et/ou indicateurs de contamination fécale dans les apports d'eau douce et les coquillages d'élevage ou de pêche récréative. Au total, huit sites sont étudiés (3 en France et 5 en Grande-Bretagne). Dans le cadre de ce projet, différents pathogènes sont recherchés dans les coquillages (moules, huîtres et coques), l'eau de mer, les rivières et les sédiments. Les prélèvements sont effectués mensuellement sur une période de 24 mois. Sont recherchés les indicateurs de contamination fécale (*E. coli* et Entérocoques), les marqueurs microbiens et chimiques de sources contamination et les microorganismes pathogènes (STEC, Salmonelles, *Campylobacter*, *Vibrio* et norovirus). Des paramètres physico-chimiques (température, salinité, turbidité, chlorophylle A) sont également mesurés. Les résultats obtenus à ce jour en France ont été présentés.

## 6 Conclusion :

Cette journée a permis de présenter le bilan des activités du LNR, des activités de Surveillance (REMI), mais également des résultats de projets de recherche ou activités menés au sein du LSEM en dehors de ses missions de LNR mais aussi des projets menés par d'autres acteurs (DGAI, ARS, AELB, CIRE, CG50). Elle a été également l'occasion d'échanger entre les différents acteurs de la filière conchylicole (producteurs, laboratoires et administration). L'enquête de satisfaction réalisée à l'issue de cette journée a montré que les participants étaient globalement satisfaits. Quelques points d'amélioration ont été suggérés et pourront être pris en compte pour les prochaines journées.

## Annexe Liste des intervenants

Benoit BELIAEFF	IFREMER Nantes Responsable Département Ressources Biologiques et Environnement.	benoit.beliaeuff@ifremer.fr
Pascal GARRY	IFREMER Nantes Laboratoire Santé Environnement et Microbiologie	Pascal.garry@ifremer.fr
Gaëlle KAELIN	IFREMER Nantes Laboratoire Santé Environnement et Microbiologie	Gaelle.kaelin@ifremer.fr
Joanna OLLIVIER	IFREMER Nantes Laboratoire Santé Environnement et Microbiologie	Joanna.ollivier@ifremer.fr
Jean-Côme PIQUET	IFREMER Nantes Laboratoire Santé Environnement et Microbiologie	Jean.come.piquet@ifremer.fr
DGAL	Bureau des produits de la mer et d'eau douce - Paris	bpmed.sdssa.dgal@agriculture.gouv.fr
Philippe FERA	Agence de l'eau Loire-Bretagne Orléans	philippe.fera@eau-loire-bretagne.fr
Loïc NOGUES	Conseil Général de la Manche Saint-Lô	loic.nogues@manche.fr
Lisa KING Yvonnick GUILLOIS	Cire Bretagne Rennes	Lisa.king@ars.sante.fr Yvonnick.guillois-becel@ars.sante.fr
Julien SCHAEFFER	IFREMER Nantes Laboratoire Santé Environnement et Microbiologie	Julien.schaeffer@ifremer.fr
Cathy TREGUIER	IFREMER La Trinité-sur-Mer Laboratoire Environnement Ressources Morbihan-Pays de Loire	Cathy.treguier@ifremer.fr
Antoine VERON	IFREMER Nantes Laboratoire Santé Environnement et Microbiologie	Antoine.veron@ifremer.fr
Dominique HERVIO- HEATH	IFREMER Brest Laboratoire Santé Environnement et Microbiologie	Dominique.hervio.heath@ifremer.fr
Alain RINCE	Université de Caen	alain.rince@unicaen.fr