

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

Pascal GARRY

Décembre 2015

**ifremer**

# Synthèse de la journée Santé Environnement et Microbiologie 2015

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>
3.1	Bilan REMI, études de zones.....	6
3.2	Plan de surveillance / plan de contrôle.....	7
<b>4</b>	<b>NORMES / REGLEMENTATION .....</b>	<b>8</b>
4.1	Evolution des normes applicables en microbiologie .....	8
<b>5</b>	<b>ETUDES /RECHERCHE ET DEVELOPPEMENT .....</b>	<b>10</b>
5.1	La salubrité microbiologique des coquillages : une longue histoire ( <i>Jean-Côme Piquet, Ifremer</i> ) ...	10
5.2	Shellfish production in land-based systems: how to manage shellfish quality ( <i>Irene Hofstad LNR Netherland</i> ) .....	10
5.3	Etude de la contamination des oursins par <i>E. coli</i> ( <i>Marc Bouchoucha, Ifremer</i> ) .....	11
5.4	Rôle des pratiques d'affinage en claire pour la qualité microbiologique des coquillages. ( <i>Jean-Côme Piquet, Ifremer</i> ) .....	11
5.5	Exemple d'une TIAC à coquillage dans un EHPAD, aspect épidémiologique et environnemental( <i>Pascaline Loury, INVS-Cire Pays de la Loire, Sylvain Parnaudeau, Ifremer</i> ) .....	12
5.6	Les Toxi-Infections Alimentaires en Pays de la Loire - Rôle de la Cellule de Veille et Alerte ARS des Pays de la Loire ( <i>Claire de Alzua et Béatrice Le Tourneau</i> ) .....	12
5.7	Bilan des TIAC à norovirus en lien avec la consommation de coquillages entre janvier 2012 et septembre 2014 ( <i>Lise Mandigny, Claire de Alzua et Pascaline Loury INVS Cire Pays de la Loire</i> ) .....	13
<b>6</b>	<b>CONCLUSION : .....</b>	<b>13</b>

## Sigles / abréviations

ARS : Agence Régionale de Santé

CIRE : Cellule Inter-Régionale d'Epidémiologie

CLI : Chair et Liquide Intervalvaire

CRC : Comité Régional de la 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 de contrôle Microbiologique des zones de production conchylicole

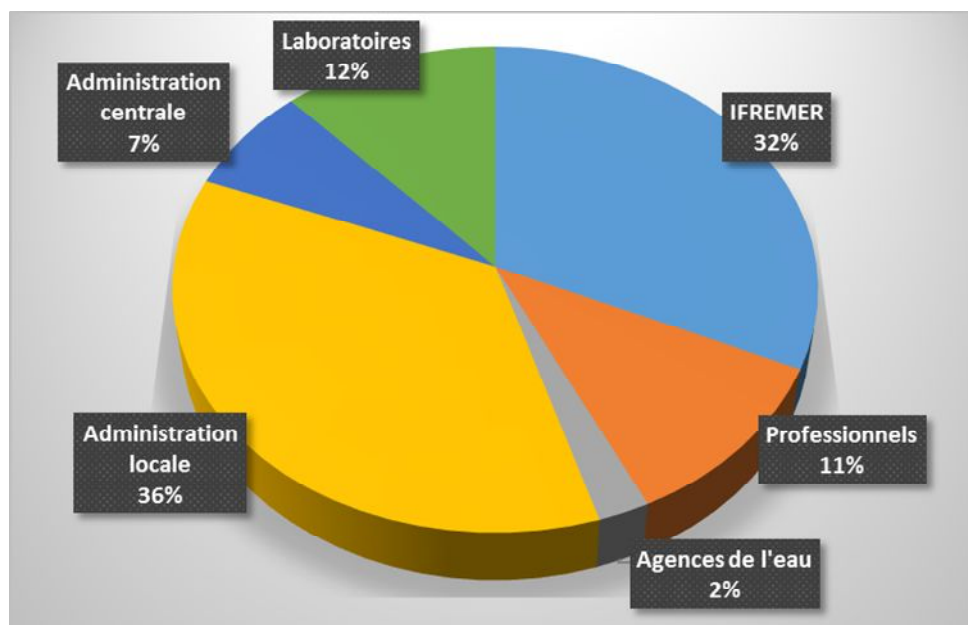
RT PCR : Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

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

TIAC : Toxi-Infection Alimentaire Collective

# 1 Introduction

La journée santé environnement microbiologie est organisée chaque année par le Laboratoire Santé, Environnement et Microbiologie (LSEM). Cette journée permet 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 2015, 126 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 agrués (Figure 1).



**Figure 1** : Origine des participants aux journées microbiologie sanitaire

Les interventions ont été réparties en 4 grandes thématiques :

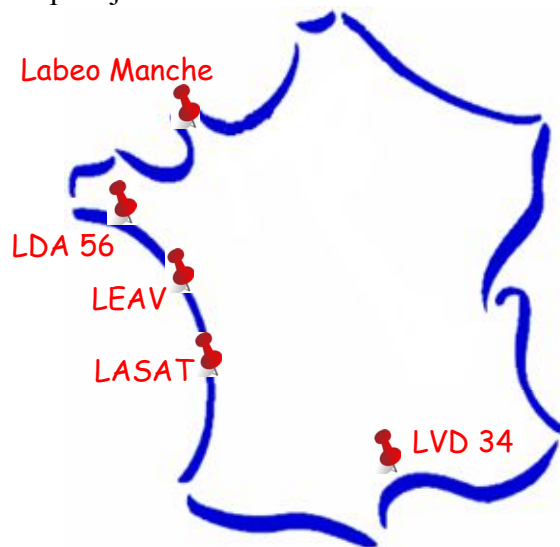
- Activités de référence 2014 (Laboratoire National de Référence)
- Activités de Surveillance
- Normes / Réglementation
- Etudes / Recherche et développement

## 2 Les activités de Référence

Pour 2014, il a été porté à la connaissance de l'IFREMER 49 foyers de Toxi-infections Alimentaires Collectives (TIAC) liés à la consommation de coquillages. Ces TIAC ont été à l'origine de 320 malades sur 597 consommateurs. Dans ce cadre, le LNR a analysé 81 lots de coquillages correspondant à 23 saisines de la DGAI. Le laboratoire a également réalisé 9 analyses suite à des alertes européennes (RASFF) et 15 recherches de norovirus dans le cadre de contrôles aux frontières.

Au niveau européen, le LNR a participé au workshop des LNR en mai 2014. 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.

Pour la mise en place d'un réseau de laboratoires agréés pour la détection des norovirus dans les mollusques bivalves, un essai Inter-Laboratoires (EIL) sur les huîtres a été organisé. Cet EIL a été suivi d'une formation des laboratoires en janvier 2015. Le réseau constitué de 5 laboratoires est en place depuis janvier 2015.



**Figure 2** : Réseau de laboratoire agréés pour la recherche de norovirus dans les huîtres

Dans le cadre de ses missions d'assistance à l'administration, le LNR a participé à différentes réunions (Plan de surveillance/plan de contrôle, réunion dans le cadre de la directive eaux conchylicoles et paquet hygiène...).

## 3 Les activités de surveillance

### 3.1 Bilan REMI, études de zones

Un bilan des activités 2014 de la surveillance microbiologique des zones de production conchylicole (REMI) a été présenté.

Le REMI concerne actuellement 351 zones classées et surveillées. En 2014, 4090 analyses *E. coli* ont été réalisées (3686 en surveillance régulière et 404 en alerte). 247 alertes ont été déclenchées (99 de niveau 0, 105 de niveau 1 et 43 de niveau 2).

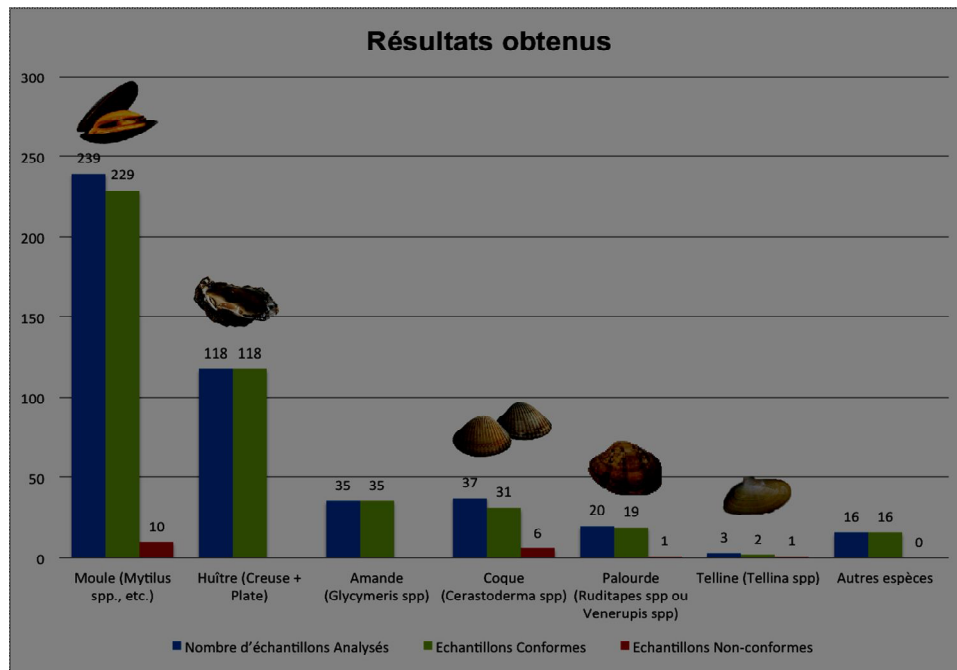
En ce qui concerne les études de zones, les différents aspects à étudier avant le classement d'une zone tels que définis dans le règlement (CE) no 854/2004 ont été rappelés. Par ailleurs la procédure de demande d'étude de zone a été présentée (Figure 3). Pour la période 2015/2017, 12 études sont programmées.



**Figure 3** : Procédure pour la mise en place d'une étude de zone.

### 3.2 Plan de surveillance / plan de contrôle

La DGAl a présenté le plan de surveillance 2014 sur *E. coli*. Il portait sur 468 prélèvements de coquillages (sur 480 programmés) au stade de la remise finale au consommateur. Ces prélèvements étaient répartis aléatoirement sur toute l'année et sur tout le territoire national. Les résultats sont présentés dans la Figure 4.



**Figure 4** : Résultats du plan de surveillance *E. coli* 2014 sur les coquillages (Source DGAI)

Les non conformités ( $> 230$  *E. coli*/100g de CLI), au nombre de 18, représentent 3,8% des lots analysés.

En 2015, un plan de surveillance *E. coli* et norovirus uniquement sur les huîtres est en cours de réalisation. Il concerne 620 lots de coquillages prélevés à la distribution (1 lot d'huître prélevé constitue 2 échantillons (*E. coli* + norovirus)). Un tiers des échantillons est prélevé du 1<sup>er</sup> janvier au 30 avril, le deuxième tiers du 1<sup>er</sup> avril au 30 octobre et le dernier tiers en novembre et décembre. Au 15 septembre, 45% des prélèvements étaient réalisés et 3 lots d'huîtres étaient non conformes pour le critère *E. coli*. Les résultats pour les norovirus sont en cours de validation.

La DGAI a également indiqué que des discussions étaient en cours pour la mise en place de l'étude européenne norovirus et VHA dans les huîtres.

## 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 2014 et 2015 :

**NF EN ISO 11133 (Juillet 2014)**

Microbiologie des aliments, des aliments pour animaux et de l'eau - Préparation, production, stockage et essais de performance des milieux de culture - Microbiologie des aliments pour animaux et des eaux

**FD CEN ISO/TR 6579-3 (Octobre 2014)**

Microbiologie de la chaîne alimentaire - Méthode horizontale pour la recherche, le dénombrement et la sérotypie des *Salmonella* - Partie 3 : lignes directrices pour la sérotypie des *Salmonella* spp.

**NF EN ISO 16649-3 (Juillet 2015)**

Microbiologie de la chaîne alimentaire – Méthode horizontale pour le dénombrement des *Escherichia coli* bêta-glucuronidase positive - Partie 3 : recherche et technique du nombre le plus probable utilisant le bromo-5-chloro-4indolyl-3 beta-D glucuronate

**XP CEN ISO/TS 17728 (Août 2015)**

Microbiologie de la chaîne alimentaire - Techniques de prélèvement pour l'analyse microbiologique d'échantillons d'aliments

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 projet de norme devrait bientôt être soumis à enquête publique.

Suite aux travaux de validation européenne de la méthode horizontale pour la recherche des virus de l'hépatite A et des norovirus dans les aliments par la technique RT-PCR en temps réel, un projet de norme (PR FR EN ISO 15216-1) a été rédigé par le comité européen de normalisation (CEN) et est soumis à enquête publique avant publication.

## 5 Etudes /Recherche et Développement

### 5.1 La salubrité microbiologique des coquillages : une longue histoire (*Jean-Côme Piquet, Ifremer*)



**Figure 5** : Marchands de coquillages à Marseille, d'après Faget D. 2005

Cet exposé introductif a fait un point sur l'histoire de la salubrité des coquillages à la fois en termes d'assainissement (du tout à l'égout à l'assainissement), mais aussi en matière de réglementation et de surveillance : Des grandes épidémies de fièvre typhoïde à la fin du XIX<sup>ème</sup>, en passant par la création de l'association d'encouragement des industries ostréicoles (AEIO) en 1913, jusqu'aux derniers textes réglementaires et la surveillance REMI actuelle).

### 5.2 Shellfish production in land-based systems: how to manage shellfish quality (*Irene Hofstad LNR Netherland*)

Irene Pol-Hofstad (Netherlands) a présenté des systèmes de production de mollusques bivalves "hors mer". Ils sont de deux types : i) des bassins extérieurs (ce premier système pourrait se rapprocher des claires) ii) des systèmes de bassins regroupés dans un bâtiment avec recyclage de l'eau. Ces deux systèmes nécessitent par ailleurs la production d'algues fourragères. Diverses questions se posent à la fois d'un point de vue réglementaire (classification, surveillance...), mais également sur les facteurs à suivre afin d'assurer la qualité de la production.

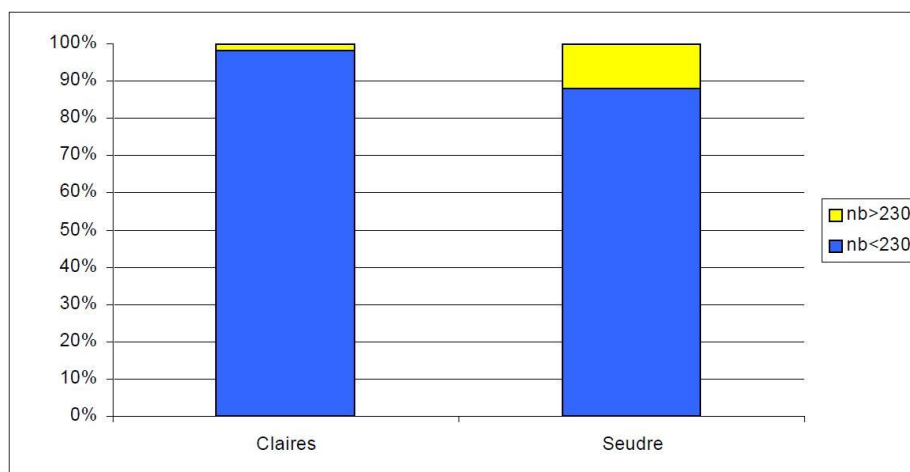
### 5.3 Etude de la contamination des oursins par *E. coli* (Marc Bouchoucha, Ifremer)

Il n'existe pas de données disponibles relatives à la contamination microbiologique des oursins en France. Face à ce constat, le Laboratoire Environnement Ressources Provence Azur Corse de l'Ifremer a réalisé une étude dont l'objectif était de mesurer les concentrations en *E. coli* dans des oursins pêchés dans une zone potentiellement soumise à une contamination microbiologique, et de comparer ces résultats aux concentrations mesurées dans des moules prélevées simultanément sur le même site. Les résultats montrent qu'il est possible d'observer des concentrations élevées en *E. coli* dans les oursins (jusqu'à 92 000 *E. coli* / 100g CLI) et que les niveaux de contamination des oursins peuvent dépasser ceux des moules. Il a également été mis en évidence une relation entre les précipitations et la contamination microbiologique des oursins, notamment à proximité de petits tributaires.

### 5.4 Rôle des pratiques d'affinage en claire pour la qualité microbiologique des coquillages. (Jean-Côme Piquet, Ifremer)

L'affinage dans les claires est une étape finale de la production d'huîtres qui permet d'en améliorer les qualités organoleptiques. Le passage en claires concerne 40% de la production ostréicole française. Les claires sont des bassins creusés dans l'argile, dont l'alimentation en eau de mer est maîtrisée.

Une étude a été menée dans l'estuaire de la Seudre où la contamination en *E. coli* des huîtres issues de claires et des huîtres directement issues de l'estuaire a été suivie. L'étude a montré que le niveau de contamination en *E. coli* est significativement moindre dans les claires que dans l'estuaire (données septembre 2010 à mars 2013). Ainsi, le nombre de lots de coquillages non conformes selon les critères de l'arrêté CE 2073/2005 était plus important pour les huîtres de la Seudre que pour les huîtres issues des claires (Figure 6). Cependant il faut rappeler que les durées d'affinage habituelles (14 à 28 jours) ne permettent pas de gérer la contamination en norovirus.

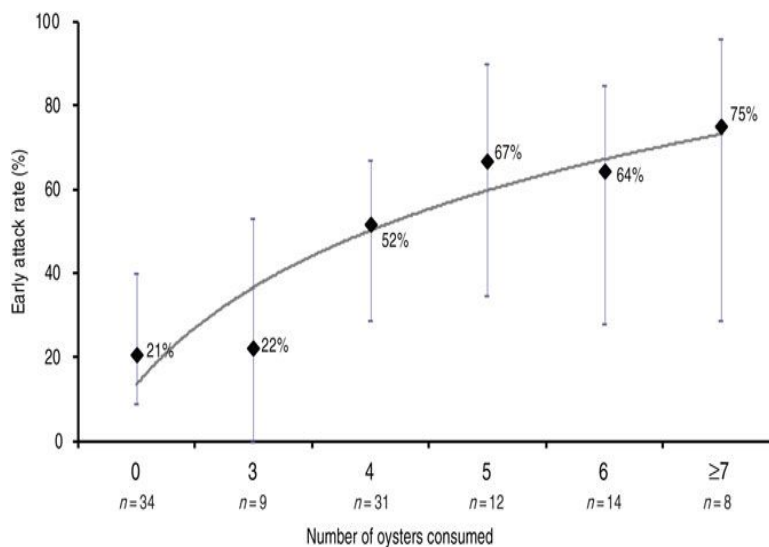


**Figure 6 :** Conformité des lots d'huîtres analysés par rapport au critère *E. coli* (lot conforme si *E. coli* < 230 /100g de CLI).

### 5.5 Exemple d'une TIAC à coquillage dans un EHPAD, aspect épidémiologique et environnemental (Pascaline Loury, INVS-Cire Pays de la Loire, Sylvain Parnaudeau, Ifremer)

La présentation portait sur un épisode de toxi-infection alimentaire collective au sein d'un Ehpads en Vendée en janvier 2012. L'épisode de gastro entérite aigüe (GEA) a touché 84 personnes (53 résidents et 31 employés sur les 160 personnes de l'Ehpads). Cette TIAC a entraîné une hospitalisation ainsi qu'un décès.

Parmi les aliments suspectés, seule la consommation d'huîtres présentait une bonne relation dose/réponse (Figure 7)



**Figure 7** : Relation dose réponse pour la consommation d'huîtres (INVS-Cire PDL)

Des prélèvements de selles ont été pratiqués chez les résidents et ont été analysés par des laboratoires de biologie médicale ou le CNR des virus entériques de Dijon. Sur les 5 échantillons analysés par ce dernier, 4 étaient positifs en norovirus (génotype II.2)

Les huîtres conservées à l'issue du repas et analysées par l'Ifremer étaient contaminées par des norovirus génotype II, tout comme les huîtres prélevées sur la zone de production dont provenaient les coquillages.

### 5.6 Les Toxi-Infections Alimentaires en Pays de la Loire - Rôle de la Cellule de Veille et Alerte ARS des Pays de la Loire (Claire de Alzua et Béatrice Le Tourneau)

Après un rappel sur le rôle de la Cellule de Veille et Alerte de l'ARS des Pays de la Loire dans le cadre des Toxi-infections alimentaires et de l'importance des déclarations obligatoires, le fonctionnement de la plateforme régionale de veille a été présenté. Enfin, un bilan des TIAC

en pays de la Loire entre 1996 et 2013 a été fait. Le nombre de déclarations est stable avec 60 TIAC confirmées / an parmi 100 suspicions. Il y a probablement une sous déclaration par les médecins. Les agents en cause sont pour 50% des cas, des toxines (*Staphylococcus*, *Clostridium*, *Bacillus cereus*), pour 34% des cas des bactéries invasives (*Salmonella*) et pour 14% des cas des norovirus.

### **5.7 Bilan des TIAC à norovirus en lien avec la consommation de coquillages entre janvier 2012 et septembre 2014 (Lise Mandigny, Claire de Alzua et Pascaline Loury INVS Cire Pays de la Loire)**

Un bilan des TIAC à norovirus en lien avec la consommation de coquillages et traitées par l'ARS Pays de la Loire entre janvier 2012 et septembre 2014 a été présenté. 25 TIAC à coquillages ont été déclarées et seules 15 ont été confirmées (sous estimation par manque d'information des medecins). Ces Tiac ont été à l'origine de 9 hospitalisations et 1 décès. 21 des tiacs étaient d'origine familiale et 4 non-familiales (3 en restauration, et 1 en EHPAD).

Dans 72% des cas l'aliment consommé était des huîtres, et dans 76 % des cas l'aliment avait été acheté dans le commerce. Dans la moitié des cas, le prélèvement alimentaire n'a pas été réalisé (pas de reste, pas de numéro de lot...). A chaque fois qu'une coproculture a été prescrite et une recherche virale demandée, norovirus a été détecté. Deux points essentiels pour la confirmation de TIAC à norovirus ont été rappelés : 1/ l'identification et la conservation alimentaire et 2/la réalisation de coprocultures un excellent outil diagnostique, mais pour lequel il est difficile de motiver les patients.

## **6 Conclusion :**

Cette journée a permis de présenter le bilan des activités du LSEM de l'Ifremer : référence (LNR), surveillance (REMI) et recherche, mais aussi le cadre de ses activités de référence (LNR), des résultats de projets ou activités menés par d'autres acteurs (LER, DGAI, ARS, CIRE,). 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

Pascal GARRY	IFREMER Nantes Laboratoire Santé Environnement et Microbiologie	pascal.garry@ifremer.fr
Cédric KERGARAVAT	IFREMER Nantes Laboratoire Santé Environnement et Microbiologie	cedric.kergaravat@ifremer.fr
Noëlie DEBRAY	IFREMER Nantes Laboratoire Santé Environnement et Microbiologie	noelie.debray@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
Marc BOUCHOUCHA	Laboratoire Environnement Ressources Provence-Azur-Corse	marc.bouchoucha@ifremer.fr
Irène HOFSTAD	LNR Netherland	irene.pol@rivm.nl
Pascaline LOURY	INVS-CIRE Pays de la Loire	pascaline.LOURY@ars.sante.fr
Sylvain PARNAUDEAU	IFREMER Nantes Laboratoire Santé Environnement et Microbiologie	sylvain.parnaudeau@ifremer.fr
Claire DE ALZUA	Cellule de veille et d'alerte - ARS des Pays de la Loire	claire.DEALZUA@ars.sante.fr
Lise MANDIGNY	CHU Nantes	lise.MANDIGNY@chu-nantes.fr