

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

Pascal GARRY

Mai 2017

**ifremer**

## Synthèse de la journée Santé Environnement et Microbiologie 2016

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>5</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>7</b>
<b>4</b>	<b>BILAN DES TIAC A COQUILLAGES.....</b>	<b>7</b>
<b>5</b>	<b>CLASSEMENT ET SUIVI DES ZONES A EXPLOITATION « PARTICULIERES » (PROJET D’INSTRUCTION).....</b>	<b>8</b>
<b>6</b>	<b>PLAN EUROPEEN D'ETUDE DE LA PREVALENCE DE NOROVIRUS DANS LES HUITRES .....</b>	<b>8</b>
<b>7</b>	<b>NORMES / REGLEMENTATION .....</b>	<b>8</b>
<b>8</b>	<b>ETUDES /RECHERCHE ET DEVELOPPEMENT .....</b>	<b>9</b>
<b>8.1</b>	<b>Projet d’étude de la résistance bactérienne des Escherichia coli isolés de coquillages Plan Ecoantibio 2017 (Anne Brisabois, Anses).....</b>	<b>9</b>
<b>8.2</b>	<b>Le risque parasitaire lié à la consommation de coquillages (I. Villena, Université Reims Champagne-Ardenne, CHU Reims).....</b>	<b>9</b>
<b>8.3</b>	<b>Quantification de la contamination par les virus et les parasites Protozoaires dans les coquillages (Pascal Garry, Ifremer ; I. Villena, Université Reims Champagne-Ardenne, CHU Reims).....</b>	<b>10</b>
<b>8.4</b>	<b>Les Escherichia coli potentiellement pathogènes dans l’environnement littoral : cas des STEC et des EPEC (Michèle Gourmelon, Ifremer) .....</b>	<b>10</b>
<b>9</b>	<b>CONCLUSION : .....</b>	<b>10</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

EIL : Essai Inter-Laboratoire

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

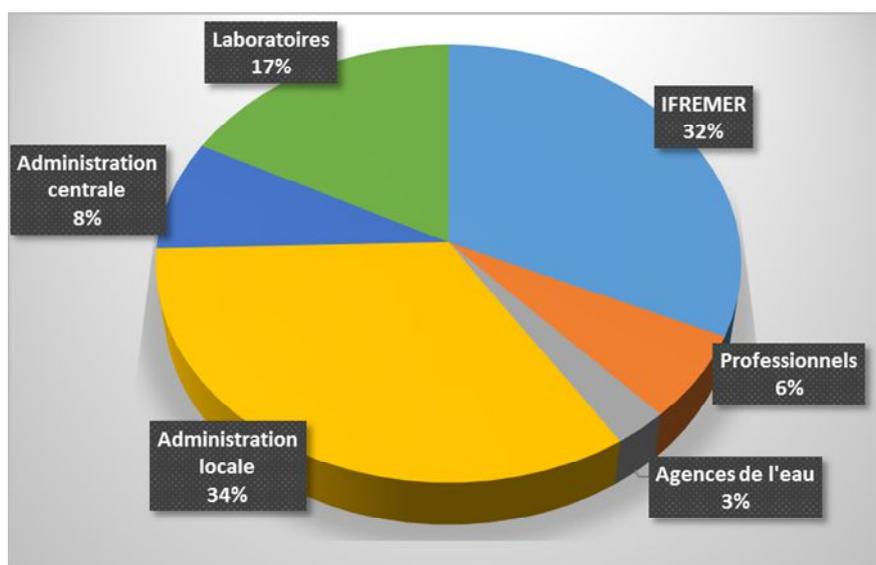
RT PCR : Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

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 2016, 110 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 (Figure 1).



**Figure 1** : Origine des participants à la journée microbiologie sanitaire

Les interventions ont été réparties en 4 grandes thématiques :

- Activités de référence 2015 (Laboratoire National de Référence microbiologie des coquillages)
- Activités de surveillance
- Normes / Réglementation
- Etudes / Recherche et développement

## 2 Les activités de Référence

Pour 2015, il a été porté à la connaissance de l'IFREMER 23 foyers de Toxi-infections Alimentaires Collectives (TIAC) liés à la consommation de coquillages. Ces TIAC ont été à l'origine de 281 malades sur 1010 consommateurs. Dans ce cadre, le LNR a analysé 27 lots de coquillages correspondant à 20 saisines de la DGAI. Le laboratoire a également réalisé la recherche de norovirus sur 3 lots de coquillages suite à des dysfonctionnement de structures d'assainissement d'eaux usées en période d'épidémie hivernale de gastroenterite aigue.

Au niveau européen, le LNR a organisé le workshop des LNR en mai 2015.

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.

Suite à 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, tissus digestifs et acide nucléique a été organisé et une formation pratique des laboratoires pour la détection des norovirus a été réalisée en janvier 2015. Le réseau constitué de 5 laboratoires est en place depuis octobre 2015. Pour les EILs le laboratoire développe un système d'inscription et de saisie des résultats en ligne qui sera mis progressivement en place en 2016

Un bilan des actualités en normalisation (française, européenne et internationale) a également été présenté.

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 2015 de la surveillance microbiologique des zones de production conchylicole (REMI) a été présenté.

Le REMI concerne actuellement 356 zones classées et surveillées. En 2015, 3934 analyses *E. coli* ont été réalisées (3688 en surveillance régulière et 246 en alerte). 171 alertes ont été déclenchées (80 de niveau 0 ; 74 de niveau 1 et 17 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 2).

12 études ont démarrées en 2015 et 5 ont débutées en 2016.

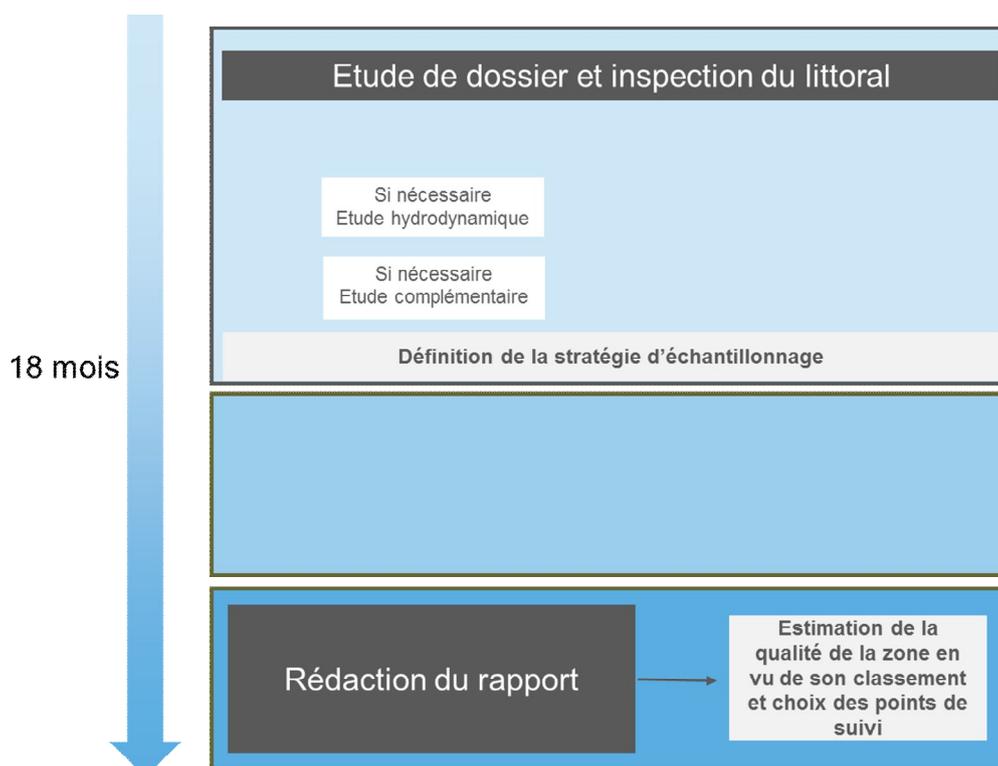


Figure 2 : Procédure pour la mise en place d'une étude de zone.

### 3.2 Plan de surveillance / plan de contrôle

La DGAI a présenté le plan de surveillance 2015 sur *E. coli*. Il portait sur 610 prélèvements d'huîtres au stade de la remise finale au consommateur. Ces prélèvements étaient répartis aléatoirement sur toute l'année et sur tout le territoire national. 4 non conformités ont été détectées. Les niveaux de contamination étaient de 330, 350 460 et 490 *E. coli* / 100g de chair et liquide intervalvaire (CLI). Sur les même coquillages un plan de surveillance norovirus a été réalisé. La présence de norovirus a été mise en évidence sur 40 échantillons (sur 608 analysés). La quantification a été réalisée sur les 40 échantillons positifs (cf. figure 3).

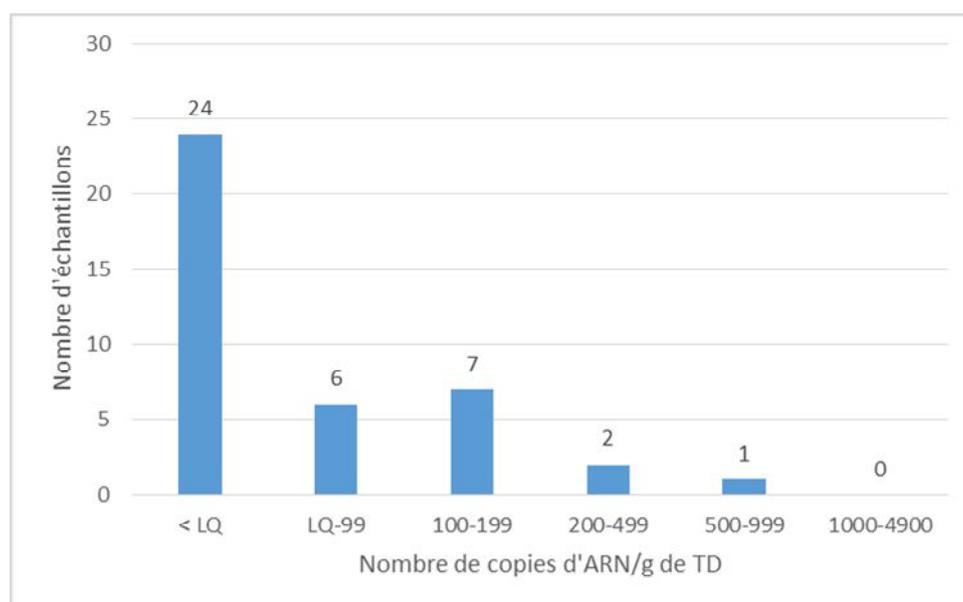


Figure 3 : Résultats de quantification des norovirus dans les échantillons positifs

## 4 Bilan des TIAC à coquillages

La DGAI a fait un bilan des TIAC tous agents pathogènes confondus et dans lesquels la consommation de coquillages était suspectée. Ainsi 96 TIAC (765 malades) ont été déclarés ces TIAC représentent 7,26% de la totalité des TIAC déclarées en France.

Sur ces 96 TIAC l'agent incriminé n'a été « confirmé » que pour 10 d'entre elles et ces dernières ont concerné 79 malades. Dans 3 des 10 cas, norovirus est l'agent confirmé, dans 2 cas il s'agissait de toxines, les autres cas ne concernaient in fine pas les coquillages.

En conclusion dans beaucoup de ces TIAC, les coquillages ne sont pas incriminés *in fine*.

## 5 Classement et suivi des zones à exploitation « particulières » (projet d'instruction)

Le projet d'instruction présenté concerne potentiellement des zones dont l'exploitation est aléatoire et fonction de la présence de ressources. Il s'agit de zones à exploitation occasionnelle (zones dites à éclipses). Ces zones actuellement classées mais sont sans point ni surveillance officielle (REMI) ou avec une surveillance très parcellaire.

Les modalités générales de suivi de ces zones ont été présentées. Dans un premier temps il s'agit de recenser ces zones : zones sans suivi avec possibilité d'exploitation ou surveillance insuffisante, dans ce cas il convient de déterminer si le suivi peut être amélioré. Ces zones sont listées à part dans l'Arrêté Préfectoral de classement avec la mention « exploitation soumise à autorisation préalable et sous conditions particulières », sans précision de classement.

Ces zones doivent faire l'objet d'une demande d'autorisation d'exploitation par les organisations professionnelles. Après validation de la demande (DDTM), est mis en place un premier suivi analytique (*E. coli*) avant exploitation. Selon les résultats, un arrêté préfectoral d'autorisation avec classement B (minimum) ou C est émis et la zone est l'objet d'un suivi renforcé pendant l'exploitation et les alertes sont gérées de la même façon que les zones « classiques ».

## 6 Plan européen d'étude de la prévalence de norovirus dans les huîtres

L'objectif de l'étude est d'estimer la prévalence de norovirus dans les huîtres au niveau des zones de production européennes et au niveau des lots conditionnés dans les centres d'expédition en Europe. L'étude est réalisée pendant 2 ans du 1<sup>er</sup> nov. 2016 au 31 oct. 2018. Pour la France 74 zones de production et 167 centres d'expédition seront échantillonnés représentant un total de 2892 échantillons. Sur chacun des prélèvements l'analyse qualitative sera réalisée par les 5 labos agréés puis la quantification par le LNR.

## 7 Normes / Réglementation

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.

Un point sur les normes devant être publiées a été fait :

**ISO 6887-3** : Préparation des échantillons, (...) Partie 3 : Règles spécifiques pour la préparation des produits de la pêche. Publication sous la forme NF EN ISO 6887-3 prévue en avril 2017

**ISO 21872** : Méthode horizontale pour la recherche des espèces potentiellement entéropathogènes *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* et *Vibrio vulnificus*

**PR NF EN ISO 15216-1**: Méthode horizontale pour la recherche des virus de l'hépatite A et norovirus par la technique RT-PCR en temps réel –Partie : méthode de quantification  
Publication de la NF EN ISO 15216-1 prévue en mai-juin 2017

## 8 Etudes /Recherche et Développement

### 8.1 Projet d'étude de la résistance bactérienne des *Escherichia coli* isolés de coquillages Plan Ecoantibio 2017 (Anne Brisabois, Anses)

Après un rappel sur l'émergence de résistances bactériennes aux antibiotiques et du risque associé, le projet mené par l'ANSES de Boulogne sur mer a été présenté.

Ce projet a pour objectif, entre autre, d'identifier le potentiel de résistance aux antibiotiques des isolats d'*E.coli* isolés des mollusques bivalves. L'étude se déroule sur les échantillons (broyats) issus du plan de surveillance DGAL/SDSSA/2015-1140 (2016) et envoyés par les laboratoires agréés après avoir dénombrés les *E. coli*. Aucun résultat n'a été présenté, l'étude étant dans sa phase initiale.

### 8.2 Le risque parasitaire lié à la consommation de coquillages (I. Villena, Université Reims Champagne-Ardenne, CHU Reims)

Les trois principaux parasites pathogènes pour l'homme (*Giardia duodenalis*, *Toxoplasma gondii* et *Cryptosporidium parvum*) ont été présentés. Les hôtes, les sources de contamination et le cycle de chacun de ces parasites ont été détaillés de même que les pathologies associés à chacun de ces protozoaires. Les méthodes d'analyse pour leur détection ont également été présentés. Enfin un bilan des quelques données de prévalence dans les coquillages a été fait (cf tableau suivant)

	<i>Cryptosporidium spp</i>	<i>Giardia duodenalis</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>	Pays	References
<i>Crassostrea giga</i>	13.0%	13%	16.6%	Italy, netherlands	Putignani <i>et al.</i> , 2011 ; Shets <i>et al.</i>
<i>Oestrea edulis</i>	54.8%	ND	ND	Spain, Italy, UK, Ireland	Gomez-Couso <i>et al.</i> , 2003
<i>Mytilus edulis</i>	73%	18%	0%	Canada, France	Levesqua <i>et al.</i> , 2010 ; Li <i>et al.</i> 2006
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	34%	17%	8%	Spain, Italy, UK, Ireland, Turkey	Aksoy <i>et al.</i> , 2014 ; Giangaspero <i>et al.</i> , 2014 ; Gomez-Couso <i>et al.</i> , 2003 ; Marangi <i>et al.</i> 2015
Clams	24%	ND	3.6	Spain, Italy, UK, Ireland	Gomez-Couso <i>et al.</i> , 2003 ; Molini <i>et al.</i> 2007 ; Putignani <i>et al.</i>
Cockles	35.4%	ND	ND	Spain, Italy, UK, Ireland, Brasil	Gomez-Couso <i>et al.</i> , 2003 ; Guiguet Leal <i>et al.</i> , 2008

ND Non déterminé

### 8.3 Quantification de la contamination par les virus et les parasites Protozoaires dans les coquillages (*Pascal Garry, Ifremer ; I. Villena, Université Reims Champagne-Ardenne, CHU Reims*)

Les principaux résultats de cette étude financée dans le cadre d'une convention recherche et développement de l'ANSES ont été présentés. Cette étude est la première portant sur le développement d'un protocole commun de détection des virus entériques (norovirus, rotavirus) et des parasites (*Cryptosporidium*, *Toxoplasma* et *Giardia*) dans les coquillages. Elle a ainsi permis de mettre en commun certaines étapes telles que l'analyse des tissus digestifs, et l'utilisation du kit NucliSens® pour l'extraction des acides nucléiques. Cette optimisation du protocole pourra être poursuivie et la méthode pour la détection des protozoaires caractérisée (limite de détection, sensibilité...).

Ce travail a également permis d'obtenir les premières données de contamination des coquillages par les trois parasites au niveau de zones d'élevage classées B, soumises à des apports d'origine agricole et humaine. Les prélèvements ont été réalisés mensuellement sur six zones de productions pendant un an. Concernant les parasites, une contamination des coquillages (huîtres et moules) par *T. gondii* a été retrouvée au mois de décembre (2 échantillons sur 71). Aucun *Cryptosporidium parvum*, ni *Giardia intestinalis* n'a été détecté dans les échantillons analysés.

Concernant les norovirus d'origine humaine (GI, GII, GIV), les contaminations observées recourent la période hivernale et l'épidémie GEA dans la population. Aucun rotavirus n'a été détecté.

### 8.4 Les *Escherichia coli* potentiellement pathogènes dans l'environnement littoral : cas des STEC et des EPEC (*Michèle Gourmelon, Ifremer*)

Cette étude a été financée dans le cadre d'un projet interreg. La première partie de l'étude portait sur la détection et l'isolement des *E. Coli* potentiellement pathogènes (STEC et EPEC) dans l'environnement et les coquillages. Les prélèvements ont été réalisés sur trois sites : un dans les Côtes d'Armor (baie de la Fresnaye) et deux dans la Manche (le Havre de Regnéville et le Havre de la Vanlée) de février 2013 à janvier 2015. 238 échantillons de coquillages, 216 d'eau douce, 39 de sédiments et 12 d'eau de mer ont été réalisés. Après enrichissement les gènes *stx* et *eae* ont été recherchés et 54,1% des échantillons étaient positifs. Les souches isolées ont été caractérisées par différentes techniques de typage (sérotypage PFGE, MLST..), et la capacité à former des biofilm a également été testée. 75 serotypes ont ainsi été identifiés (18 STEC et 57 EPEC). En résumé, il a été observé une grande diversité des souches, certaines pouvant former des biofilms. Il a été mis en évidence des souches présentant des profils potentiellement pathogènes pour l'homme.

## 9 Conclusion :

Cette journée a permis de présenter le bilan des activités du LSEM de l'Ifremer : référence (LNR), surveillance (REMI) et recherche, mais aussi des résultats de projets ou activités menés par d'autres acteurs. Elle a été également l'occasion d'échanger entre les différents acteurs de la filière conchylicole (producteurs, laboratoires et administration).

## Annexe Liste des intervenants

<i>NOM / PRENOM</i>	<i>ORGANISME</i>	<i>CONTACT</i>
GARRY Pascal	IFREMER Nantes - Laboratoire Santé Environnement et Microbiologie	pascal.garry@ifremer.fr
PIQUET Jean-Côme	IFREMER Nantes - Laboratoire Santé Environnement et Microbiologie	jean.come.piquet@ifremer.fr
CHABANNE Charlotte	DGAI - Direction Générale de l'Alimentation	bpmed.sdssa.dgal@agriculture.gouv.fr
BRISABOIS Anne	ANSES – Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail	anne.brisabois@anses.fr
ROUYER Pascal	DGAI – Direction Générale de l'Alimentation	bpmed.sdssa.dgal@agriculture.gouv.fr
HOSSEN Virginie	DGAI – Direction Générale de l'Alimentation	bpmed.sdssa.dgal@agriculture.gouv.fr
OLLIVIER Joanna	IFREMER Nantes - Laboratoire Santé Environnement et Microbiologie	joanna.ollivier@ifremer.fr
HARTNELL Rachel	CEFAS - Centre for Environment, Fisheries and Aquaculture Science	rachel.hartnell@cefass.co.uk
VILLENA Isabelle	UNIVERSITE DE REIMS	ivillena@chu-reims.fr
GOURMELON Michèle	IFREMER Nantes - Laboratoire Santé Environnement et Microbiologie	michele.gourmelon@ifremer.fr