

PRE

SIONS

ET

MÉDITERRANÉE OCCIDENTALE

IM

PACTS

PRESSIONS ET IMPACTS

MÉDITERRANÉE OCCIDENTALE

JUIN 2012

PRESSIONS BIOLOGIQUES ET IMPACTS ASSOCIÉS

Introduction d'organismes microbiens pathogènes

Contamination des coquillages par des bactéries pathogènes pour l'homme

Dominique Hervio-Heath,
Michèle Gourmelon (Ifremer, Brest),
Martial Catherine (Ifremer, Nantes).



1. CONTEXTE GÉNÉRAL

L'appréciation de la contamination microbiologique des zones de production conchylicole est basée sur la recherche de l'indicateur de contamination fécale *Escherichia coli*. Cependant, cet indicateur ne permet pas d'identifier l'origine des contaminations, animale ou humaine, dont la connaissance permettrait d'apporter des éléments importants pour évaluer le risque pour la santé humaine.

En France, les contaminations d'origine urbaine sont principalement représentées par les eaux en sortie de station d'épuration, les eaux usées des habitats dispersés ne possédant pas d'assainissement autonome ou dont l'assainissement n'est pas conforme, et la mauvaise séparation de certains réseaux d'eaux usées et d'eaux pluviales.

Les sources de contamination animale sont majoritairement issues des sièges d'exploitations agricoles : épandage des lisiers et fumiers, écoulement diffus et pâturages. Les élevages aviaires étant plus confinés, les contaminations qui leur sont liées sont moins visibles. Des contaminations liées à la présence d'oiseaux sauvages, dont les oiseaux de bord de mer, existent également mais elles sont très ponctuelles [1]. Des marqueurs existent pour cibler et distinguer l'origine de la contamination animale de façon plus précise [2] [3] [4].

Le tableau 1 dresse la liste des bactéries pathogènes d'origine entérique et leurs sources potentielles. Une contamination d'origine humaine est susceptible d'être associée à une présence de microorganismes potentiellement adaptés à l'homme, tels que les virus entériques – norovirus ou virus de l'hépatite A – rejetés par les individus malades en quantités très importantes lors des périodes épidémiques hivernales [5] ou à des bactéries entériques telles que des *E. coli* pathogènes et des salmonelles. Une pollution d'origine animale est plutôt à l'origine de zoonoses¹, en raison de la présence de bactéries ou de parasites excrétés par des animaux porteurs sains ou malades tels que les *E. coli* pathogènes comme les *E. coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC ; Shiga-Toxin-producing *Escherichia coli*² ; ancienne dénomination *Escherichia coli* vérotoxiques, VTEC), *Campylobacter* et certains sérotypes de *Salmonella* ou *Cryptosporidium* et *Giardia* [6] [7] [8].

Bactéries pathogènes	Habitat primaire	Présence	Maladie
<i>Salmonella</i> spp. <i>Shigella</i> spp. <i>Yersinia</i> <i>E. coli</i> pathogènes, STEC	Intestins des animaux à sang chaud et de l'homme	Taux variables chez les porteurs sains ou les malades ; sporadique et faible taux dans les fruits de mer ; peut s'accumuler dans les coquillages	Gastro-entérites Gastro-entérites ; colite hémorragique
<i>Campylobacter</i>	Oiseaux, intestins des animaux à sang chaud	Sporadique, et faible taux ; accumulation possible dans les coquillages	Gastro-entérites
<i>Listeria monocytogenes</i>	Intestins des animaux à sang chaud et de l'homme		Listériose

Tableau 1 : Les bactéries pathogènes d'origine entérique et leurs sources potentielles.

L'apport de microorganismes d'origine entérique et notamment de pathogènes *via* ces sources de contamination a pour conséquence des problèmes économiques et sanitaires notables : (i) fermetures ou déclassements de zones conchylicoles et de baignade, et (ii) Toxi-Infections Alimentaires Collectives (TIAC) suite à la consommation de coquillages crus ou insuffisamment cuits.

Les zones de production conchylicole exploitées par les professionnels en vue de la commercialisation de coquillages font l'objet d'un classement et d'une surveillance sanitaire pour le critère *E. coli* [9]. Cependant, il n'existe pas de dispositif de surveillance du milieu marin pour les bactéries pathogènes pour l'homme. Bien que l'on ne dispose que de peu d'études épidémiologiques évaluant le risque infectieux, la responsabilité de *Salmonella* et de *Campylobacter* a été démontrée dans des épisodes de gastro-entérites chez l'homme, après consommation de coquillages [10] [11] [12]. D'autres bactéries peuvent aussi provoquer des gastro-entérites comme *Shigella* sp., les *E. coli* pathogènes, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*,

¹ Infections naturellement transmissibles de l'animal à l'homme.

² STEC : bactérie responsable des colites hémorragiques.

Vibrio parahaemolyticus, *V. cholerae* ou *V. vulnificus*. Ces bactéries sont rencontrées dans les eaux littorales, mais les données dans les coquillages sont irrégulières et rares pour certaines d'entre elles. Dans ce cas, il sera difficile de faire un état des lieux exhaustif dans le cadre de la DCSMM. Bien que responsables de TIAC, les vibrions pathogènes pour l'homme, et en particulier *Vibrio parahaemolyticus*, qui ont été retrouvés sur les côtes françaises [13], ne seront pas considérés dans le cadre de la DCSMM en raison de la présence autochtone de ces bactéries dans le milieu marin – elles ne sont pas d'origine entérique.

Dans ce document ne seront rapportées que des données issues d'études locales, souvent réalisées dans un contexte sanitaire ou dans le cadre de projets de recherche. Il est important de souligner qu'elles ne sont pas exhaustives et donc généralisables à d'autres sites ou à d'autres périodes de l'année.

2. SUIVI DE LA CONTAMINATION DES COQUILLAGES PAR DES BACTÉRIES PATHOGÈNES

Dans la majorité des études citées ci-dessous, la recherche des bactéries pathogènes dans les coquillages est réalisée après une étape de culture (pour les bactéries cultivables). Elles peuvent également être recherchées directement dans les coquillages, sans étape de culture, par le biais de méthodes moléculaires plus sensibles comme l'amplification génique ou la PCR³ [14].

2.1. PRÉSENCE DE *SALMONELLA* DANS LES COQUILLAGES

Créé en 1989, le réseau de contrôle microbiologique des zones conchylicoles (REMI) comprend d'une part un dispositif de surveillance régulière de l'environnement, dont l'objectif est d'évaluer et de suivre – par le biais de l'indicateur *E. coli* – l'évolution du niveau de contamination bactériologique des zones de production de coquillages, et d'autre part un dispositif d'alerte qui est déclenché lors d'événements – pluviométrie importante, rejets d'eaux usées, contexte épidémique, etc. – susceptibles de dégrader la qualité des zones conchylicoles (zones d'élevage et gisements naturels) afin que l'administration puisse décider de mesures de protection des consommateurs [15].

Une étude conduite dans le cadre du REMI entre 1989 et 1991, avec les laboratoires côtiers de la Direction de l'Environnement et de l'Aménagement du Littoral de l'Ifremer, sur l'ensemble du littoral français et dans la plupart des zones de production de coquillages, montre un taux de prévalence de *Salmonella* de 3,3 % : 136 résultats positifs sur 4 070 échantillons de coquillages. Parmi les zones étudiées, la Méditerranée apparaît peu contaminée avec la présence de *Salmonella* dans 2,2 % des 2 151 échantillons analysés.

Le taux de prévalence de *Salmonella* reporté par les services vétérinaires dans des coquillages prélevés dans des établissements et destinés à la consommation (1989-1992) est également faible, à 0,7 % (37 résultats positifs sur 5 620 analyses). Il varie de 0,15 % à 1,5 %, ce taux étant le plus élevé chez les coquillages fouisseurs, coques et palourdes [16]. Plus récemment, le plan de surveillance de la présence de *Salmonella* dans les produits prélevés dans les lots avant leur mise sur le marché, mis en place en 2006 et 2007 par la Direction Générale de l'Alimentation, a montré un taux de prévalence inférieur à 0,1 %.

En raison de la faible prévalence de *Salmonella* dans les zones de production de coquillages, en particulier dans les zones classées A (environ 2 %) et B (environ 3 %) et de la lourdeur analytique [17], la recherche systématique de cette bactérie n'est plus effectuée en routine dans le cadre du réseau de surveillance REMI depuis 1991, mais essentiellement à l'occasion d'études particulières :

- une étude publiée en 1995 révèle la présence de salmonelles dans les coquillages de l'étang de Thau [18].
 - Deux études récentes réalisées en Italie sur la contamination microbiologique des coquillages indiquent l'absence de *Salmonella* dans l'ensemble des échantillons de moules analysés (120 et 80, respectivement) [19] [20].
- En France, peu de données récentes sont disponibles. Une synthèse des données relatives aux foyers de TIAC déclarés en France entre 1996 et 2005 indique que tous les départements français ont déclaré au moins un foyer pendant cette période. Cet article montre que les coquillages étaient impliqués dans 5,9 % des TIAC (250 sur 4 260) et que les salmonelles ont été identifiées ou suspectées comme agent responsable dans 31 de ces 250 foyers de TIAC [12]. Les principales espèces identifiées sont *S. enteritidis* et *S. typhimurium*. Cependant, l'article ne précise pas s'il s'agit de coquillages vivants ou de plats cuisinés.

3 Polymérase Chain Réaction, technique de biologie moléculaire utilisée pour la recherche et l'identification des bactéries pathogènes.

2.2. PRÉSENCE D'ESCHERICHIA COLI PRODUCTEURS DE SHIGA-TOXINES DANS LES COQUILLAGES

Les *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines ou STEC sont considérées comme des bactéries potentiellement pathogènes, *E. coli* O157:H7⁴ étant le sérotype le plus fréquemment retrouvé lors d'infections humaines liées à la consommation de produits carnés. À ce jour, aucune infection associée à la consommation de coquillages n'a été rapportée. Cependant, la présence d'exploitations agricoles en amont de zones côtières et estuariennes pourrait contribuer à la contamination microbiologique de ces zones et des coquillages et représenter un risque sanitaire.

Une recherche de ces bactéries *E. coli* producteurs de shiga-toxines dans des coquillages – moules, huîtres et coques – a été initiée entre juillet 2002 et août 2004 sur le littoral français [21]. Une seule station de prélèvements a été sélectionnée pour cette étude dans la sous-région marine, en zone D. Cette dernière est localisée à la sortie d'une station d'épuration et à proximité d'une zone d'activités agricoles.

Les gènes *stx* codant pour un des facteurs majeurs de la virulence chez les STEC sont détectés dans les bouillons d'enrichissement des échantillons analysés. Ils sont présents dans 51,7 % des échantillons issus de la zone D (Tableau 2).

Collection sites (Area*)	Shellfish species	Stx-positive SF† enrichments / total no. of SF† enrichments	Stx-positive Hp‡ enrichments / total no. of Hp‡ enrichments	Stx-positive enrichments / total no. enrichments (% stx-positive enrichments)	E. coli count per 100 g of SF			Isolation of STEC (no. of STEC strains)§
					Geometric mean	Range	No. of samples	
Site 7 (D)	Oysters	4/7	4/7	8/14 (57.1)	2 419.3	<100 – 160 000	7	P (1)

*Shellfish from B-category were collected in growing areas or natural beds farmed or not; †SF, shellfish flesh; ‡Hp, hepato-pancreas; §N, negative; P, positive.

Tableau 2 : Détection des STEC et des gènes *stx* dans les coquillages de Méditerranée occidentale pour cette étude.

Bien que des *E. coli* producteurs de Shiga-toxines soient présents dans les coquillages, le risque d'infection humaine due à la consommation de ces coquillages semble limité pour deux raisons principales : (i) les concentrations observées sont généralement faibles et les souches isolées lors de cette étude ne portent pas les gènes associés à une virulence marquée chez l'homme, *i.e.*, les gènes *eae* et *stx2*, (ii) l'étape de purification de 48 heures réalisée pour les coquillages en provenance de la zone B devrait éliminer la majorité de ces coliformes.

Cette étude a porté sur une seule station de prélèvement. Il n'est donc pas possible ni prudent de généraliser les informations obtenues ci-dessus à l'ensemble de la sous-région marine.

2.3. PRÉSENCE DE LISTERIA MONOCYTOGENES DANS LES COQUILLAGES

Les *Listeria* sont des bactéries ubiquistes très répandues dans l'environnement. *Listeria monocytogenes* a été isolée dans de nombreuses espèces animales, principalement des bovins, ovins et caprins. Néanmoins, il est important de souligner que la transmission à l'homme se fait dans la plupart des cas par voie alimentaire et que la transmission de l'animal à l'homme n'a pas été documentée. Des produits de la mer ont été suspectés ou confirmés être responsables de cas de listériose humaine, cependant il n'a pas été déterminé si ces cas étaient le résultat de contamination dans l'environnement ou si celle-ci avait eu lieu pendant la transformation des produits.

2.4. PRÉSENCE D'AUTRES BACTÉRIES PATHOGÈNES DANS LES COQUILLAGES

La responsabilité des *Campylobacter* dans les TIAC est connue depuis une vingtaine d'années. Les aliments d'origine animale – lait non pasteurisé, viandes peu cuites, tout particulièrement la volaille – en sont les principaux véhicules, mais ils ne sont pas la seule voie de transmission de ces bactéries : l'eau contaminée peut

⁴ O157:H7 correspond à un code d'identification d'une variété sérologique de la bactérie *E. coli*. Si la plupart des *E. coli* sont bénignes, le type O157:H7 le plus souvent mis en cause, est potentiellement mortel.

également propager la maladie. Cette bactérie est très sensible aux conditions environnementales défavorables – salinité, congélation etc. – mais elle peut survivre plusieurs jours à basse température dans l’eau de mer. Les cas de campylobactériose humaine secondaire à la consommation de coquillages sont très rares. À ce jour, en France, aucun cas d’infection à *Campylobacter* n’a été associé à la consommation de coquillages. Cependant, quelques études réalisées en France ont montré la présence de *Campylobacter* dans des coquillages issus de l’environnement ou mis sur le marché. Très peu de données sont disponibles quant à la présence d’autres espèces de bactéries entériques potentiellement pathogènes pour l’homme dans l’environnement marin ou dans les coquillages, *i.e.*, *Yersinia*... Elles ne seront donc pas considérées dans ce document.

3. CONCLUSIONS

En France, très peu d’études récentes concernant la contamination des coquillages par des bactéries pathogènes sont disponibles. De ce fait, les données sur les niveaux actuels de contamination des eaux littorales et des zones conchylicoles sont insuffisantes. Dans les études citées dans ce rapport, les méthodes utilisées pour la recherche des bactéries pathogènes d’origine entérique sont essentiellement basées sur la culture (méthode qualitative). Les méthodes actuelles impliquent culture et/ou détection moléculaire et plusieurs d’entre elles sont en cours de validation au niveau européen et international. Dans le cadre de la DCSMM, si le suivi de ce type de contamination était considéré, ces méthodes pourraient être utilisées afin d’évaluer la qualité microbiologique et les niveaux de contamination des coquillages de façon plus exhaustive.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Fogarty L.R., Haack S.K., Wolcott M.J., Whitman R.L., 2003. Abundance and characteristics of the recreational water quality indicator bacteria *Escherichia coli* and enterococci in gull faeces. *Journal of Applied Microbiology*, 94, 865-878.
- [2] Gourmelon M., Caprais M.P., Mieszkin S., Marti R., Wery N., Jardé E., Derrien M., Jodas-Hécart A., Communal P.Y., Jaffrezic A., Pourcher A.M., 2010. Development of microbial and chemical MST tools to identify the origin of the faecal pollution in bathing and shellfish harvesting waters in France. *Water research*. 44 : 4812-4824.
- [3] Lu J., Santo Domingo J.W., Lamendella R., Edge T., Hill S., 2008. Phylogenetic diversity and molecular detection of bacteria in gull feces. *Applied and environmental microbiology*. Vol 74 n°13 : 3969-3976.
- [4] Lu J., Ryu H., Hill S., Schoen M., Ashbolt N., Edge T.A., Santo Domingo J.S., 2011. Distribution and potential significance of a gull fecal marker in urban coastal and riverine areas of southern Ontario, Canada. *Water research*. 45 : 3960-3968.
- [5] Lopman B.A. *et al.*, 2004. Two epidemiologic patterns of norovirus outbreaks: surveillance in England and Wales, 1992-2000. *Emerging Infectious Diseases*, 9(1) : 71-77.
- [6] Hancock D., Besser T., LeJeune J., Davis M. et Rice D., 2001. The control of VTEC in the animal reservoir. *Int. J. Food Microbiol.* 66:71-78.
- [7] Brown P.E., Christensen O.F., Clough H.E., Diggle P.J., Hart C.A., Hazel S., Kemp R., Leatherbarrow A.J.H. et al., 2004. Frequency and spatial distribution of environmental *Campylobacter spp.* *Appl Environ Microbiol* 70, 6501-6511.
- [8] Cox P., Griffith M., Angles M., Deere D., Ferguson C., 2005. Concentrations of pathogens and indicators in animal feces in the Sydney watershed. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 5929-5934.
- [9] Anon, 2004. Règlement (CE) n° 854/2004 du Parlement Européen et du Conseil du 29 avril 2004 fixant les règles spécifiques d'organisation des contrôles officiels concernant les produits d'origine animale destinés à la consommation humaine.
- [10] Abeyta C., Deeter F.G., Stott R.F., Wekell M.M., 1993. *Campylobacter jejuni* in a Washington state shellfish growing bed associated with illness. *Journal of Food Protection.*, 56: 323-325.
- [11] Greenwood M., Winnard G., Bagot., 1998. An outbreak of *Salmonella enteritidis* phage type 19 infection associated with cockles. *Communicable disease and Public Health* 1: 35-37.
- [12] Delmas G., Gallay A., Espié E., Haeghebaert S., Pihier N., Weill F-X., De Valk H., Vaillant V., Désenclos J-C., 2006. Les toxi-infections alimentaires collectives en France entre 1996 et 2005, *Bulletin Epidemiologique Hebdomadaire*, No 51-52, Institut de Veille Sanitaire.
- [13] Hervio-Heath D., Colwell R.R., Derrien A., Robert-Pillot A., Fournier J.M., Pommepuy M., 2002. Occurrence of pathogenic vibrios in coastal areas of France. *Journal of Applied Microbiology*. 92: 1129-1135.
- [14] Dupray E., Caprais M.P., Derrien A., Monfort P., Convenant A., Penot J., Fach P., Dilasser F., Pérelle S., Grout J., Federighi M., Jugiau F., Rama F., 1999. Flux bactériens et qualité sanitaire des coquillages en baie de la Fresnaye. Dans : *Pollutions diffuses : du bassin versant au littoral*, Éditions Ifremer, 169-178.
- [15] Catherine M., Raffin B., 1996. La surveillance microbiologique et le classement des zones de production de coquillages du littoral français. Actes du colloque "Huitièmes entretiens du centre Jacques Cartier", Annecy, 5-8 décembre 1995. *Épidémiol. santé anim.*, 29 : 99-106.
- [16] Raffin B., 1994. Qualité microbiologique des coquillages vivants livrés à la consommation humaine directe. Synthèse des résultats des contrôles vétérinaires 1989-1992. Ifremer R.INT.DEL/Nantes/94.18.
- [17] Miossec L., 1991. Présence des salmonelles dans les coquillages du littoral français entre janvier 89 et avril 90. Ifremer DEL/QM/SMN/Nantes.
- [18] Angeli J.P., 1995. DEAL Sète.
- [19] Suffredini E., Corrain C., Arcangeli G., Rasolato L., Manfrio A., Rossetti B., Biazzi E., Mioni R., Revon E., Losio M.N., Sanavio G., Croci L., 2008. Occurrence of enteric viruses in shellfish and relation to climatic-environmental factors. *Letters in Applied Microbiology*, 47: 467-474.
- [20] Serracca L., Verani M., Battistini R., Rossini I., Carducci A., Ercolini C., 2010. Evaluation of Adenovirus and *E. coli* as indicators for human enteric viruses presence in mussels produced in la Spezia Gulf (Italy). *Letters in Applied Microbiology*. 50: 462-467.
- [21] Gourmelon M., Montet M.P., Lozach S., Le Mennec C., Pommepuy M., Beutin L., Vernozy-Rozand C., 2006. First isolation of Shiga toxin 1d producing *Escherichia coli* variant strains in shellfish from coastal areas of France. *Journal of Applied Microbiology*. 100: 85-97.