

## **AVIS**

### **de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail**

**relatif à « l'évaluation du risque lié à la présence d'*E. coli* dans les coquillages »**

---

*L'Anses met en œuvre une expertise scientifique indépendante et pluraliste.*

*L'Anses contribue principalement à assurer la sécurité sanitaire dans les domaines de l'environnement, du travail et de l'alimentation et à évaluer les risques sanitaires qu'ils peuvent comporter.*

*Elle contribue également à assurer d'une part la protection de la santé et du bien-être des animaux et de la santé des végétaux et d'autre part l'évaluation des propriétés nutritionnelles des aliments.*

*Elle fournit aux autorités compétentes toutes les informations sur ces risques ainsi que l'expertise et l'appui scientifique technique nécessaires à l'élaboration des dispositions législatives et réglementaires et à la mise en œuvre des mesures de gestion du risque (article L.1313-1 du code de la santé publique).*

*Ses avis sont rendus publics.*

---

L'Anses a été saisie le 03 août 2012 par la Direction Générale de l'Alimentation d'une demande d'évaluation du risque lié à la présence d'*E. coli* dans les coquillages.

#### **1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE**

Le règlement (CE) n°2073/2005 fixe un critère microbiologique de 230 *E. coli*/100 grammes de chair et liquide intervalvaire (CLI) pour les mollusques bivalves vivants. Ce critère, indicateur de contamination fécale, s'applique aux produits mis sur le marché pendant leur durée de conservation et est contrôlé sur la base d'un plan d'échantillonnage à deux classes (jugement de conformité sur la base d'un échantillon représentatif) ; le produit est conforme s'il présente une teneur inférieure ou égale à 230 *E. coli*/100g de CLI.

Par ailleurs, le règlement (CE) n°854/2004 établit le classement des zones de pêche et culture marine de coquillages selon le critère microbiologique du règlement (CE) n°2073/2005 ; En cas de non-conformité des mollusques aux normes sanitaires, l'autorité compétente est dans l'obligation de fermer la zone de production concernée.

Le critère microbiologique du règlement (CE) n° 2073/2005 est donc déterminant pour :

- la protection du consommateur,
- la gestion des autorisations de production dans les zones de cultures et de pêche / classement des zones,
- les mesures ponctuelles particulières de gestion (fermetures ou déclassements temporaires) après dépassement de ce critère.

Ce critère pourrait être modifié sur proposition de la Commission Européenne (DG SANCO) pour retenir le critère adopté par le Codex alimentarius et basé sur un plan

d'échantillonnage à 3 classes avec  $n=5$ ,  $m=230$  *E. coli*/100g de CLI,  $c=1$  et  $M=700$  *E. coli*/100g de CLI. La gestion du classement des zones et des fermetures pour non-conformité seraient également basées sur ce nouveau critère. Sur demande de la Commission, le LR-UE a étudié l'impact de ce nouveau critère. L'annexe 1 décrit les différences des plans d'échantillonnage à deux et trois classes ainsi que leur interprétation de conformité associée.

Il est demandé à l'Anses, au regard du rapport du LR-UE (Report of the EU-RL regarding possible harmonisation of EU and Codex microbiological standards for live bivalve molluscs, march 2012 ; joint à la saisine) :

- Concernant la pertinence du critère 230 *E. coli*/100g de CLI, s'il est possible et utile de fixer une teneur maximale différente de 230 et réaliste dans le respect de la préservation de la santé des consommateurs. Si un critère de 700 *E. coli*/100g de CLI serait de nature à apporter une moindre protection du consommateur.
- Concernant le jugement de conformité d'un lot, d'évaluer si le critère basé sur un plan à 3 classes est effectivement plus pertinent que le plan à 2 classes en terme de gain sanitaire s'agissant du jugement de conformité sur un lot de produits prêts à être mis sur le marché.
- Concernant la surveillance des zones, d'évaluer les plans d'échantillonnage à 2 classes et à 3 classes en terme de protection des consommateurs, de détection des non-conformités et de performance de méthode.
- Concernant le jugement de conformité d'une zone sur la base d'un échantillon, d'évaluer les options de gestions vis-à-vis du risque pour le consommateur en cas d'une conservation du dispositif actuel à 2 classes ou d'un dispositif à 3 classes (Projets DGAL de diagrammes de gestion des zones de production de coquillages ; joint à la saisine). Outre l'appréciation de la performance sanitaire, évaluer la pertinence d'une reconduction de l'analyse de non-conformité sous 48h.

Suite à la réunion de cadrage du 17 octobre 2012, réunissant les membres du CES « Evaluation des risques biologiques liés aux aliments » et le pétitionnaire de la saisine, une reformulation des questions s'est avérée nécessaire. Les questions instruites sont les suivantes :

- Quelle est la pertinence du critère *E. coli* dans les coquillages ?
- Le plan d'échantillonnage à 3 classes présente-t-il un gain de protection du consommateur par rapport à un plan à 2 classes pour l'estimation de la conformité des lots ?
- Le classement des zones de pêches serait-il fortement modifié par l'utilisation d'un plan à 3 classes, plutôt qu'à 2 classes ?
- Le diagramme de gestion des zones de production de coquillages, tel qu'il est présenté en annexe de la saisine, est-il pertinent ?

## **2. ORGANISATION DE L'EXPERTISE**

L'expertise a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « Qualité en expertise – Prescriptions générales de compétence pour une expertise (Mai 2003) ».

L'expertise relève du domaine de compétences du comité d'experts spécialisé (CES) « Evaluation des risques biologiques liés aux aliments ». L'Anses a confié l'expertise à des

rapporteurs externes et à l'unité « Méthodologie et Etudes en Microbiologie et Santé Animale » en interne. Le LNR « Microbiologie des coquillages » a été auditionné à propos du rapport du LR-UE.

Les travaux ont été présentés au CES « Evaluation des risques biologiques liés aux aliments » le 18 janvier 2013 tant sur les aspects méthodologiques que scientifiques. Ils ont été adoptés par ce CES réuni le 12 février 2013.

### 3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU CES

#### 3.1. Quelle est la pertinence du critère *E. coli* dans les coquillages ?

Cette partie se propose de faire la synthèse des avis existants et des publications récentes concernant la pertinence de l'indicateur *E. coli*. Différents avis et rapports de l'Anses traitent de la pertinence du critère *E. coli* dans les coquillages, à savoir :

- le bilan des connaissances relatives aux virus transmissibles à l'homme par voie orale (Afssa, 2007),
- l'évaluation du dispositif de surveillance microbiologique des zones de production conchylicole et du risque lié à la consommation des coquillages, notamment dans la situation du bassin d'Arcachon (Afssa, 2008),
- la note relative à la mise en place de critères de classement et de surveillance des gisements autorisés pour la pratique de la pêche à pied de loisir (Afssa, 2008),
- la contamination de coquillages marins par le virus de l'hépatite A : Recommandations pour l'amélioration de la maîtrise du risque (Anses, 2010),
- l'évaluation du risque lié à la réouverture d'une zone conchylicole fermée pour cause de présence avérée de calicivirus (norovirus et sapovirus) dans les coquillages vivants (Anses, 2011).

Les différents dangers associés à la consommation de coquillages sont bien identifiés (Vaillant et al., 2012) :

- Les virus entériques d'origine humaine principalement (*Caliciviridae*, dont norovirus et sapovirus, les rotavirus, astrovirus, adénovirus des sous types 40 et 41, entérovirus et paréchovirus) sont à l'origine de TIAC (Toxi Infection Alimentaire Collectives) attribuées à la consommation de coquillages. Les norovirus sont les agents responsables de 31% de ces TIAC déclarées (données françaises entre 1996-2010) (Vaillant et al., 2012). Le virus de l'hépatite A est le deuxième agent viral mis en cause dans les épidémies à coquillages. Deux épidémies relativement récentes ont été attribuées à une contamination des coquillages par ce virus en France. Si aucune épidémie d'hépatite E liée à l'ingestion de coquillages n'a été détectée en France, la contamination de coquillages par ce virus a été détectée au Royaume-Uni et est relative à des coquillages prélevés à proximité d'une conduite de sortie d'épuration d'un abattoir (Crossan et al., 2012).
- Les entérobactéries, d'origine terrestres, potentiellement présentes dans les coquillages (*Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli*, *Campylobacter*) sont rarement à l'origine d'infections ou de TIAC transmises par consommation de coquillages (Vaillant et al., 2012). Une faible survie de ces bactéries et une purification rapide des coquillages vis-à-vis de ces bactéries dans l'environnement marin salin pourraient en expliquer l'origine.

- Des parasites pathogènes pour l'homme ont été mis en évidence dans les coquillages (*Cryptosporidium*, *Giardia*, *Toxoplasma gondii*, *Cyclospora*, microsporidies). Il existe donc un risque potentiel mais qui n'a pas été mis en évidence par la détection d'épidémie humaine (en France ou dans le monde).
- Des bactéries mieux adaptées au milieu marin, pouvant survivre et s'y multiplier (*Vibrio cholerae*, *Vibrio cholerae* non O1/non O139, *Vibrio parahaemolyticus*), sont associées à des épidémies humaines (dans le monde mais pas en France) sur les produits issus des zones conchylicoles françaises. La présence de *Vibrio parahaemolyticus*, associée à des températures élevées dans l'eau de mer, dans un certain nombre de zones conchylicoles, est avéré (Anses, 2012).
- Les phycotoxines d'origine phytoplanctoniques sont à l'origine d'épidémies humaines en France et dans le monde. Les toxines concernées peuvent provoquer des diarrhées (Diarrheic Shellfish Poisoning) ou des troubles plus sévères, comme les PSP (Paralytic Shellfish Poisoning). Pour prévenir les troubles liés à ces toxines des dispositifs de surveillances spécifiques ont été mis en place (REPHY IFREMER ; Afssa, 2008).

La recherche d'un indicateur de contamination fécale ou de rejets d'origine terrestre dans le milieu marin est justifiée. Le réservoir des deux principaux virus à l'origine du plus grand nombre de TIAC attribuées à la consommation de coquillages (norovirus et virus de l'hépatite A) est humain. La contamination des coquillages est liée à la situation épidémiologique (épidémie dans la population), au traitement des eaux usées (d'origine humaine ou non) et à la situation du point de rejet des eaux usées traitées vis à vis de la production conchylicole. Il était donc naturel de choisir un indicateur lié à la contamination fécale (d'origine humaine ou non) comme *E. coli*.

L'objectif général de la surveillance microbiologique est de minimiser le nombre de cas et le risque de TIAC ou d'épidémie, lié à l'ingestion de coquillages contaminés. La pertinence de l'indicateur *E. coli* se pose par rapport aux 4 objectifs de la surveillance définis ci-dessous :

### 3.1.1. Classification des zones en fonction de leur vulnérabilité vis à vis des apports anthropiques

Pour rappel, cette classification repose sur un certain nombre d'analyses basées sur le critère *E. coli*. Les zones classées D sont impropres à la conchyliculture. Les zones classées C nécessiteraient un reparcage des produits conchylicoles en zone propre, ce qui n'est pas mis en place et rend de fait les zones classées C impropres à la conchyliculture. Les zones classées B nécessitent que les produits conchylicoles issus de cette zone fassent l'objet d'une purification avant la mise sur le marché. Les zones classées A permettent une commercialisation directe.

L'évaluation théorique de la pertinence de cette classification pour le consommateur nécessiterait pour chaque type de zone, de connaître au cours du temps le niveau de contamination des dangers associés à la consommation de coquillages en relation avec les niveaux de contamination en *E. coli* dans les coquillages. A l'heure actuelle, ces données ne sont pas disponibles. Cependant le retrait des zones classées C et D de l'élevage conchylicole ou de la pêche est à l'évidence une pratique de bon sens, vu le niveau de contamination microbiologique et /ou chimique servant à définir les seuils.

L'efficacité du classement ne repose pas que sur le seul dénombrement de l'indicateur, même répétée mensuellement. Elle repose aussi sur :

- le choix du contour de la zone, censée être homogène ;
- la représentativité des points de prélèvement choisis pour définir le classement de la zone, et en particulier de la production conchylicole qui y réside. Ces points de

suivi doivent aussi être proches des sources de contamination anthropiques. La réponse simultanée à ces deux contraintes pour une même zone n'est pas forcément compatible ;

- la précision souhaitée de l'estimation du critère microbiologique (tenant compte de la précision analytique, de la variabilité dans la zone et de la prise d'essai) ;
- La sensibilité de la zone.

Les points de prélèvements des zones sont régulièrement redéfinis (Afssa, 2008a).

### **3.1.2. Une surveillance régulière pérenne du milieu conchylicole, servant à confirmer ou non le statut de la zone, voir à déclencher un processus d'alerte.**

Si la confirmation du statut du classement de la zone repose sur les mêmes critères que la classification des zones, une surveillance efficace suppose une détection précoce et sensible (capacité à détecter un événement inhabituel). Le positionnement des points de suivi (qui devrait être proche des sources de contamination potentielles), la fréquence du suivi (adaptée à une durée de contamination potentielle) et le seuil d'alerte (le plus sensible et rapide possible) ne correspondent pas complètement à l'objectif du classement des zones, or ce sont les mêmes points et la même fréquence de suivi qui correspondent à ces deux objectifs pourtant très distincts.

Il n'est donc pas si étonnant que le dispositif soit parfois déficient à détecter une anomalie de contamination, aboutissant à des cas humains. En l'absence d'autre signal d'alerte que le suivi mensuel des points par une surveillance microbiologique, la possibilité de détection d'un accident rare (en zone classée A ou B les accidents sont rares), de courte durée mais suffisamment importante (par exemple 48h), associée à une contamination virale et présentant une confirmation positive au bout de 48 heures est très faible (sous l'hypothèse d'une homogénéité de contamination) et est finalement inefficace pour prévenir des cas humains d'hépatite A (Anses, 2010; Thebault et al., 2012). Ces remarques sont confirmées par les récentes TIAC recensées (Anses, 2010; Anses, 2011; Vaillant et al., 2012).

Le dispositif de surveillance dans le milieu ne permet donc pas d'éviter un certain nombre de TIAC :

*« Un des points majeurs qui ressort de l'étude des épidémies [du virus de l'hépatite A en hiver 1999 et en été 2007 à Paimpol] liées à la consommation de coquillages est l'absence de relation entre l'indicateur de contamination fécale (soit E. coli, soit coliformes fécaux) et la présence de virus entériques humains et, de ce fait, la grande difficulté de prévenir le risque à partir des surveillances microbiologiques classiques (Butt, et al., 2004; Lees, 2000). En effet, le niveau d'E. coli est la plupart du temps conforme à la réglementation européenne dans des cas de gastroentérites ou d'épidémies d'hépatite A liées à la consommation de coquillages (Bosch et al., 2001; Boxman et al., 2006; Le Guyader et al., 2006; Le Guyader et al., 2003). Par ailleurs des cas liés à des huîtres ayant séjourné en bassin d'épuration avant consommation ont été observés (Grohmann et al., 1980; Le Guyader et al., 2006) confirmant que ces systèmes permettent l'élimination naturelle et rapide d'E. coli, tandis que celle des virus reste difficile. Aussi les deux jours de purification tels qu'anciennement préconisés par la réglementation nationale sont-ils inefficaces, en cas de contamination virale, pour obtenir un coquillage sain prêt à être consommé cru (Loisy et al., 2005; Schwab et al., 1998). » (Anses, 2010).*

*« Ce système de surveillance de la contamination bactérienne ne permet pas de conclure sur la présence d'une contamination virale, du fait de l'absence de corrélation entre la présence du virus et celle de l'indicateur bactérien. » (Anses, 2011 - voir annexe 2).*

Le classement des zones correspond à un niveau de fragilité de la zone vis à vis des rejets terrestres, compatible pour la zone classée B avec une activité conchylicole, mais ne peut prévenir, sans un déclenchement d'alerte spécifique, des cas résultants d'une contamination de courte durée. La fréquence mensuelle du suivi et la demi-vie très courte de *E. coli* dans les coquillages, ne permettent pas de détecter avec une bonne probabilité des accidents de contamination de quelques jours ou de quelques heures : la demi-vie de norovirus et du virus de l'hépatite A est bien supérieure à celle de l'indicateur *E. coli*.

Le positionnement des points doit assurer une bonne représentativité de la zone conchylicole et décrire des zones fragiles ou critiques. La compatibilité de ces critères n'est pas évidente, ni la notion de zone homogène. Dans le cas de Paimpol, les zones de dépôts ou de stockage, hautes sur l'estran, n'étaient pas des zones couvertes par le suivi microbiologique.

La mise en alerte du réseau repose sur des critères *E. coli*, signe de contaminations fécales, pouvant être associées à une contamination virale, mais aussi bactérienne ou parasitaire. Cependant, en particulier pour le risque viral, d'autres indicateurs ont été recensés et devraient être utilisés pour déclencher une alerte en complément de l'analyse bactériologique (Anses, 2011; Vaillant et al., 2012).

### **3.1.3. Un dispositif d'alerte, correspondant à une situation de risque accru aux circonstances à définir**

Le déclenchement d'une alerte aboutit, plus ou moins rapidement, à une gestion des lots conchylicoles visant à éviter la mise sur le marché des produits contaminés. Dans le cas d'une zone classée A, une augmentation modérée et pérenne de l'indicateur (confirmée en tout cas au bout des 48 heures) entraîne un différé dans la vente des lots et un dispositif de purification ou de reparcage des coquillages. Lorsque l'indicateur *E. coli* revient à un niveau conforme dans le milieu, l'alerte est levée et les produits en cours de purification peuvent être mis en vente. Comme la demi-vie de l'indicateur *E. coli* est plus courte que celle des virus, lorsque les coquillages sont contaminés par des virus (norovirus ou VHA), il peut y avoir, de façon compréhensible un décalage : bien que le niveau de l'indicateur soit redevenu conforme, les produits peuvent rester contaminés. Ce mécanisme s'est probablement produit à l'étang de Thau (quand la levée de l'alerte n'a pas évité des TIAC postérieures à celle-ci) et a déjà été rencontré dans le passé (lorsque des TIAC ont résulté de contaminations pas forcément longues mais survenues dans le milieu marin plusieurs semaines plus tôt avant les TIAC).

*« Il convient de rappeler qu'en termes de mesures, l'épisode de 2006 a montré que seule la mesure d'interdiction de commercialisation prolongée pendant un mois jusqu'à négativation des recherches virales dans les coquillages et la récession de l'épidémie de gastro-entérite aigüe a permis de prévenir l'apparition de nouvelles TIAC. » (Anses 2011 - voir annexe 3).*

### **3.1.4. Une évaluation de la qualité microbiologique des produits finis ou mis sur le marché**

Les professionnels sont dans l'obligation de mettre sur le marché des produits respectant le règlement (CE) n°2073/2005, selon lequel le critère *E. coli* doit être inférieur ou égal à 230 *E. coli*/100g de CLI dans les coquillages. Cependant, comme évoqué précédemment à propos des durées de demi-vie de l'indicateur et des virus, il n'est pas du tout évident que cela suffise pour écarter un risque important de TIAC. Certains professionnels utilisent dans ce cadre l'analyse virologique comme outil de suivi de la contamination de leurs lots avant leur mise en vente (Loisy et al., 2005). Ces contrôles sont d'autant plus nécessaires et efficaces si une traçabilité existe depuis la production jusqu'à la remise au

consommateur (compte tenu des transferts existant parfois même entre Etats membres et des opérations de reconditionnement). Cette traçabilité doit assurer une homogénéité du lot analysé, ce qui est souvent un pré-requis dans l'évaluation de l'efficacité de l'échantillonnage.

Comme l'indique un récent rapport de l'OMS, la protection de la santé publique exige une surveillance active du milieu hydrique et du produit final afin de s'assurer que les contrôles sont suffisants (WHO, 2010). Il convient de rappeler l'importance du respect des critères d'alerte et la demande faite par le projet Oméga Thau de mettre en place des systèmes d'alerte.

*« Il convient de rappeler l'importance du respect de l'obligation réglementaire de traçabilité pour ces produits. Par ailleurs, des analyses libératoires pourraient fournir des éléments d'évaluation de la sécurité des produits destinés à être mis sur le marché. »* (Anses 2011).

Il est intéressant d'examiner le résultat de quelques enquêtes environnementales qui ont suivi des épisodes de TIAC (Maalouf et al., 2010; Thomas et al., 2011). Le plus fréquemment un problème technique d'assainissement est à l'origine de la contamination des coquillages, cet épisode survenant le plus souvent suite à de fortes pluies (pendant l'épidémie hivernale). Un autre cas décrit (en France et à l'étranger) provient de mélanges de lots venant de zones salubre et insalubre (zone classée C). Enfin un dernier cas décrit, en Louisiane aux USA (1993), un ostréiculteur malade avait jeté ses excréments par dessus bord (sur un parc à huître) occasionnant une TIAC touchant six états américains. L'impact d'un accident de contamination de courte durée serait donc un élément à prendre davantage en compte en France dans la surveillance et le déclenchement des alertes (Anses, 2010 ; Anses 2011).

Si le classement des zones selon le critère *E. coli* n'est pas à remettre en cause, force est de constater que le système ne prévient pas un certain nombre de TIAC virales. Dans tous les cas la solution se trouve dans l'identification et la maîtrise des sources de contamination (Anses, 2010). De fait, la pertinence et les modalités de suivi d'*E. coli* sont sans doute à réexaminer plus précisément au regard des différents objectifs de surveillance et de l'existence d'autres sources d'informations disponibles (pluviométrie) ou envisageables (analyse virologique).

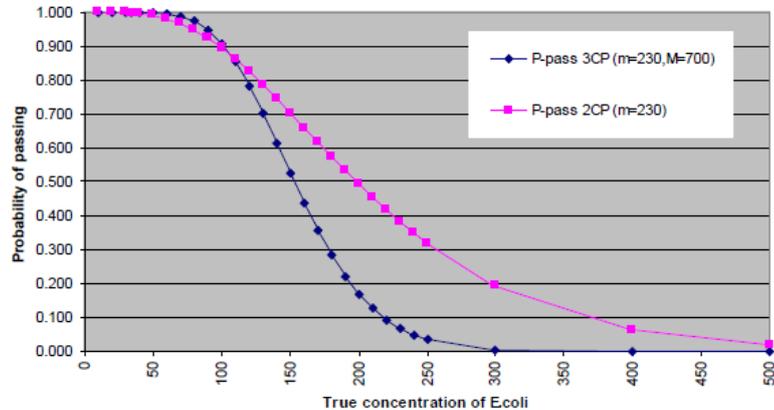
### **3.2. Le plan d'échantillonnage à 3 classes présente-t-il un gain de protection du consommateur par rapport à un plan à 2 classes pour l'estimation de la conformité des lots ?**

Le LR-UE a réalisé une comparaison de l'efficacité statistique du plan à 2 classes de la réglementation européenne actuelle ( $n=1$ ,  $c=0$ ,  $m=230$  *E. coli*/100g de CLI) et du plan à 3 classes de la norme Codex Stan 292-2008 ( $n=5$ ,  $c=1$ ,  $m=230$  et  $M=700$  *E. coli*/100g de CLI).

Les simulations effectuées par le LR-UE montrent que la probabilité d'accepter des lots de coquillages présentant une contamination inférieure à 100 *E. coli*/100g de CLI est supérieure avec le plan à 3 classes et que celui-ci devient ensuite plus sélectif que le plan à 2 classes lorsque la contamination augmente. Ainsi, un lot contaminé à 50 *E. coli*/100g de CLI a une probabilité supérieure de respecter le plan à 3 classes (0,999) que le plan à 2 classes (0,99) ; par contre, un lot contaminé à 230 *E. coli*/100g de CLI a une probabilité inférieure de respecter le plan à 3 classes (0,068) que le plan à 2 classes (0,381) (Figure 1). Ces simulations montrent donc que le plan à 3 classes est légèrement moins contraignant que le plan à 2 classes pour les contaminations faibles mais qu'il est par contre beaucoup plus sélectif pour les contaminations élevées.

Le LR-UE conclut que le respect du critère européen (probabilité de 0,99) requiert une concentration moyenne de 50 *E. coli*/100g de CLI alors que le respect du critère du Codex

alimentarius nécessite une concentration moyenne de 70 *E. coli*/100g de CLI. Pour ces niveaux de contamination, le LR-UE en déduit une augmentation marginale de la prévalence en *Salmonella* dans les coquillages mis sur le marché qui passerait de 1,0% à 1,1%.



**Figure 1** : Comparaison du plan à 2 et 3 classes : probabilité de conformité en fonction de la concentration en *E. coli* (Rapport LR-UE, 2012).

La méthode mise en œuvre par le LR-UE appelle quelques commentaires :

- Les probabilités d'acceptation des lots de coquillages sont en réalité plus élevées que celles calculées par le LR-UE. Celui-ci a considéré que les lots n'étaient pas acceptables lorsque leur contamination était 'supérieure ou égale' aux limites microbiologiques au lieu de 'strictement supérieure'. La probabilité d'accepter les lots est légèrement supérieure à celle indiquée dans le rapport. Cela ne modifie néanmoins pas les conclusions quant à la comparaison de l'efficacité relative des deux plans d'échantillonnage.

Par exemple, pour une contamination de 50 *E. coli*/100g de CLI, la probabilité d'accepter les lots est de 0,999 pour le plan à 2 classes et supérieure à 0,999 pour le plan à 3 classes. Pour une contamination de 230 *E. coli*/100g de CLI, les probabilités de respecter les plans à 2 et 3 classes sont de respectivement 0,545 et 0,232.

- Le caractère hétérogène de la contamination des coquillages par *E. coli* évoqué dans le rapport LR-UE (2012) et l'éventuelle variabilité de la contamination inter-coquillages en résultant n'a pas été retenue dans les calculs effectués par le LR-UE. Cette simplification ne modifie pas non plus les conclusions sur la comparaison des plans d'échantillonnage européen et du Codex alimentarius mais les efficacités réelles des plans d'échantillonnage proposés seraient différentes de celles présentées par le rapport LR-UE si cette variabilité était prise en compte.

Si, par exemple, on considère que la variabilité de la contamination inter-coquillages est représentée par une distribution log-normale d'écart-type 0,3 log et qu'on analyse des mélanges de 10 coquillages, les probabilités d'accepter un lot contaminé en moyenne à 50 *E. coli*/100g de CLI sont de respectivement 0,99 et 0,999 pour les plans à 2 et 3 classes. Ces probabilités sont respectivement de 0,389 et 0,074 pour un lot contaminé à 230 *E. coli*/100g de CLI.

- La dernière remarque concerne le lien entre les plans d'échantillonnage mis en œuvre et la prévalence en salmonelles des lots de coquillage mis sur le marché. La relation liant la contamination par *E. coli* et la prévalence en *Salmonella* utilisée par le LR-UE n'étant pas publiée, cette conclusion reste difficile à expertiser. Quoi qu'il

en soit, il semble que pour ce calcul le LR-UE n'a pris en compte que des lots présentant une contamination fixée à des niveaux de 50 et 70 *E. coli*/100g de CLI ce qui ne reflète pas la variabilité de la contamination des lots réellement mis sur le marché avec en particulier une plus forte probabilité de commercialiser des lots plus contaminés en *E. coli* en utilisant le critère européen plutôt que le critère du Codex alimentarius. La conclusion du LR-UE relative à l'impact du changement de critère sur la prévalence en salmonelles semble quelque peu hâtive. Pour bien faire, il faudrait caractériser les qualités des lots après contrôle dans les deux cas et relier ces contaminations par *E. coli* à des contaminations en salmonelles.

Le passage du critère microbiologique relatif à la contamination des coquillages par *Escherichia coli* basé sur le plan à 2 classes au plan à 3 classes du Codex Stan 292-2008 permet de détecter avec une plus grande efficacité les lots fortement contaminés (> 230 *E. coli*/100g de CLI) et n'a que très peu d'impact sur l'acceptabilité des lots présentant une contamination faible (<50 *E. coli*/100g de CLI). Ce plan est donc de nature à améliorer la sécurité des consommateurs sans disqualifier à tort des lots de bonne qualité, et donc sans pénaliser les producteurs, à condition, compte tenu de son coût, qu'il soit mené sans diminution du niveau de la pression de contrôle.

### **3.3. Le classement des zones de pêches serait-il fortement modifié par l'utilisation d'un plan à 3 classes, plutôt qu'à 2 classes ?**

L'application du critère du Codex alimentarius au classement des zones de production conchylicole ne se traduirait pas en fait par une multiplication par cinq du nombre d'analyses à réaliser pour juger de la qualité d'une zone (n=1). Il s'agirait d'appliquer les limites microbiologiques et les tolérances proposées dans le critère du Codex alimentarius (m=230, M=700 *E. coli*/100g de CLI, tolérance de 20%) aux résultats de surveillance acquis selon le schéma de prélèvement actuel.

Actuellement, lors de la surveillance microbiologique des zones de production conchylicole, la réglementation européenne impose 100% des résultats inférieurs à 230 *E. coli*/100g de CLI pour les zones classées A. L'application des limites du critère du Codex alimentarius consisterait à tolérer 20% de résultats supérieurs à cette limite (sans dépasser 700 *E. coli*/100g de CLI).

Partant du constat que la réglementation européenne n'est aujourd'hui pas appliquée de façon stricte par les Etats membres qui tolèrent quelques dépassements de la limite réglementaire, le LR-UE conclut que l'adoption du critère du Codex alimentarius aurait peu d'impact sur le classement des zones en catégorie A. Ainsi, en France, l'Ifremer a évalué que, sur un total de 230 zones (avec des données de surveillance de 2007, 2008, 2009), l'application du critère Codex conduirait à classer 29 zones en catégorie A contre 27 avec les critères actuels et la tolérance de 10% de résultats supérieurs à 230 *E. coli*/100g de CLI (annexe 1 du rapport du LR-UE, 2012). Ce nombre de zones classées A serait de 4 si le critère européen était appliqué de façon stricte.

### **3.4. Le diagramme de gestion des zones de production de coquillages, tel qu'il est présenté en annexe de la saisine, est-il pertinent ?**

La gestion des zones de production conchylicoles classées A repose sur un système d'alerte lorsqu'une contamination par *E. coli* est détectée. L'alerte de niveau 1 correspond à l'obtention d'un résultat de surveillance non conforme avec le plan à 2 classes et le seuil réglementaire de 230 *E. coli*/100g de CLI. Dans ce cas, les professionnels sont informés afin qu'ils puissent mettre en œuvre des actions correctives sur les coquillages issus de cette zone. Une deuxième analyse est réalisée sur la zone 24 à 48 h après le premier résultat (temps variable en fonction de la méthode analytique utilisée : NPP ou

impédancemétrie). Si ce nouveau résultat n'est pas conforme (présence de pollution dans la zone), l'alerte passe en niveau 2, la zone est temporairement fermée ou déclassée, la commercialisation directe des coquillages issus de cette zone est interdite.

L'objectif de la deuxième analyse réalisée 24-48 h après le déclenchement de l'alerte peut se concevoir de deux manières, soit comme analyse de confirmation du premier résultat pour éviter de pénaliser le producteur avec une fausse alerte, soit comme analyse permettant d'évaluer le caractère persistant de la pollution d'origine fécale.

Dans le premier cas, l'analyse de confirmation n'a pas beaucoup d'intérêt car le risque de détecter à tort une concentration supérieure à 230 *E. coli*/100g de CLI est très faible ; par exemple, lorsque la contamination en *E. coli* de la zone est inférieure à 50 *E. coli*/100g de CLI (les données de l'Iframer montrent que la contamination moyenne sur 3 ans des zones classées A sont pratiquement toutes inférieures à 20 *E. coli*/100g de CLI), la probabilité pour ne pas respecter le seuil réglementaire de 230 *E. coli*/100g de CLI est inférieure 0,001.

Cette seconde analyse ne se justifie donc que comme élément permettant d'évaluer le caractère ponctuel ou persistant de la pollution fécale. Le cahier des spécifications techniques et méthodologiques REMI dans sa version du 24 février 2012 évoque d'ailleurs bien une « contamination persistante » dans le cas de l'alerte de niveau 2.

Un dépassement du seuil de 230 *E. coli*/100g de CLI non confirmé par un deuxième prélèvement à 24-48 h signe donc vraisemblablement plutôt une pollution fécale ponctuelle qu'une fausse alerte lors de la première analyse.

Il est donc certainement utile de s'intéresser plus précisément aux risques liés aux coquillages présents dans la zone à ce moment là et en particulier au risque viral dès que la contamination microbiologique dépasse le seuil de 230 *E. coli*/100g de CLI.

Le passage à un système de gestion similaire mais basé sur une surveillance réalisée avec 5 analyses avec les seuils de non conformité du Codex alimentarius modifierait peu les caractéristiques du système en cas d'une contamination par *E. coli* inférieure à 50 *E. coli*/100g de CLI. En effet, dans ce cas, le risque de fausse alerte serait encore plus faible qu'avec le système actuel (inférieur à 0,001), rendant encore plus inutile le recours à une analyse de confirmation.

Par contre, ce dispositif aurait comme avantage de détecter plus efficacement des pollutions par *E. coli*. La probabilité de détecter une contamination de 230 *E. coli*/100g de CLI avec le système actuel est de 0,46, elle passerait à 0,77 avec une surveillance basée sur cinq analyses.

Dans tous les cas la faible corrélation et les différences de demi-vie entre l'indicateur et la contamination virale, vu le faible pas de temps du suivi de routine (mensuel), font que dans une zone où les épisodes de contaminations sont rares dans le temps mais peuvent être élevés ne suffisent pas à prévenir les TIAC virales. Les TIAC d'origine virale de ces dernières années n'avaient pas été prévenues par la surveillance dans des zones classées A ou B. La fréquence de suivi (TIAC Norovirus), et la zone concernée (zone de dépôt) non suivie par le REMI (TIAC VHA Paimpol) étaient dans ces cas, concernés.

La mise en alerte du système repose sur des indicateurs externes (forte pluviométrie, accident de station épuration, tempête, épidémie dans la population) (Note de la DGAL du 28 novembre 2012 : DGAL/SDSSA/N2012-8243) et devrait comporter la recherche de virus par RT-PCR en vue de prévenir des TIAC dans les populations (Anses, 2010). L'interprétation du signal virologique peut en situation d'alerte (moins de 48 heures après l'accident) s'appuyer sur le logigramme déjà proposé par l'Afssa (Afssa, 2007). Une contamination microbiologique anormale et la détection de génome viral devant être interprété comme un risque de TIAC viral accru pour le consommateur (Afssa, 2007).

Les professionnels pourraient s'appuyer sur des analyses ad-hoc leur permettant d'éviter la mise sur le marché de produits contaminés (Anses, 2010; Anses, 2011). La décroissance jusqu'à l'absence de détection du signal virologique peut-être envisagée.

« *La constatation d'un génome de virus ne permet pas de témoigner de son caractère infectieux, critère majeur pour les gestionnaires du risque. Dans ce cadre, le groupe de travail a élaboré un logigramme d'interprétation d'un résultat positif [...]. À l'inverse, dans un échantillon considéré, l'absence de génome viral est relativement informative puisque dans les conditions d'assurance qualité adaptées, elle est synonyme de l'absence de virus infectieux.* » (Afssa, 2007).

Il convient de rappeler que la variabilité de contamination au sein d'un lot doit être prise en compte pour garantir un risque faible ou négligeable.

### **3.5. Conclusion du CES « Evaluation des risques biologiques liés aux aliments »**

L'indicateur *E. coli* est un indicateur de contamination fécale. A cette contamination environnementale peuvent être associés des agents bactériens (salmonelles, *Campylobacter* ou des *E. coli* pathogènes), des parasites (*Cryptosporidium*, *Toxoplasma*) et surtout des virus, fréquemment associés aux TIAC à coquillages. L'indicateur *E. coli* (avec d'autres critères de vulnérabilité) permet de classer des zones plus ou moins exposées, aux rejets terrestres (d'origine animale ou humaine). Si la pertinence de l'indicateur *E. coli* vis-à-vis de la classification des zones n'est pas à remettre en cause, force est de constater que le système ne prévient pas un certain nombre de TIAC virales. La demi-vie de certains virus, tels que VHA et norovirus, dans les coquillages est plus longue que celle de l'indicateur *E. coli*. La surveillance mensuelle des zones ne permet pas à l'heure actuelle d'éviter les TIAC dues à des accidents de courte durée. La pertinence et les modalités de suivi du critère *E. coli* sont sans doute à réexaminer au regard des différents objectifs de surveillance et de l'existence d'autres sources d'informations (analyse virologique). Les différents avis de l'Anses, rappelés dans cet avis, ont proposé des éléments pour la gestion du risque viral dans les coquillages en complément de la surveillance du critère *E. coli* pour prévenir ou limiter l'importance de tels accidents.

Le passage d'un critère microbiologique relatif à la contamination des coquillages par *E. coli* basé sur la réalisation d'une analyse interprétée selon le plan à 2 classes du règlement CE n°2073/2005 à la réalisation de cinq analyses interprétées selon le plan à 3 classes du Codex Stan 292-2008 permet de détecter avec une plus grande efficacité les lots fortement contaminés (> 230 *E. coli*/100g de CLI) et n'a que très peu d'impact sur l'acceptabilité des lots présentant une contamination faible (<50 *E. coli*/100g de CLI). Ce plan est donc de nature à améliorer la sécurité des consommateurs sans disqualifier à tort des lots de bonne qualité, et donc sans pénaliser les producteurs, à condition, compte tenu de son coût, qu'il soit mené sans diminution de niveau de la pression de contrôle.

L'application des limites microbiologiques et de la tolérance de 20% de résultats compris entre 230 et 700 *E. coli*/100g de CLI de la norme Codex à la classification des zones de production conchylicoles n'aurait que peu d'impact sur le classement actuel des zones puisqu'une tolérance de 10% est déjà appliquée quant au respect strict de la limite de 230 *E. coli*/100g de CLI.

Lors de la gestion des alertes, la seconde analyse, réalisée 24 à 48h après le premier résultat, ne se justifie que pour évaluer le caractère ponctuel ou persistant de la pollution fécale et non pour confirmer ou infirmer le premier résultat. Le passage de une à cinq analyses dans le schéma de surveillance des zones conchylicoles et de gestion des alertes en cas de pollution fécale permettrait de détecter plus efficacement les augmentations de la contamination par *E. coli* sans pénaliser les opérateurs lorsque la contamination est faible (diminution du taux de fausse alerte). La réalisation d'une

seconde analyse 24 à 48 heures après le début de l'alerte permet de caractériser la persistance de la pollution fécale de la zone. Dans tous les cas, une évaluation spécifique du risque lié à la contamination virale pendant cette période de pollution devrait être menée dès le déclenchement de l'alerte.

#### **4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE**

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail endosse les conclusions du CES « Evaluation des risques biologiques liés aux aliments ».

**Le directeur général**

Marc Mortureux

#### **MOTS-CLES**

*Escherichia coli* ; coquillage ; plan d'échantillonnage ; indicateur

## BIBLIOGRAPHIE

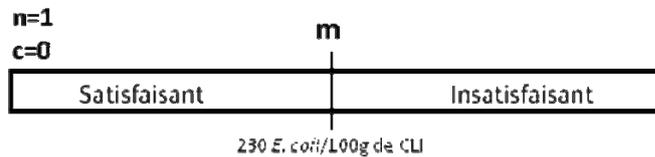
- Afssa (2007). Rapport : Bilan des connaissances relatives aux virus transmissibles à l'homme par voie orale. (<http://www.anses.fr/Documents/MIC-Ra-VirusOral.pdf>)
- Afssa (2008a). Rapport : Evaluation du dispositif de surveillance du milieu et évaluation du risque lié à la consommation des coquillages, notamment dans la situation du bassin d'Arcachon (saisine n°2006-SA-0254).
- Afssa (2008b). Note relative à la mise en place de critères de classement et de surveillance des gisements autorisés pour la pratique de la pêche à pied de loisir (saisine n°2007-SA-0208). (<http://www.anses.fr/Documents/MIC2007sa0208No.pdf>)
- Anses (2010). Rapport : Contamination de coquillages marins par le virus de l'hépatite A, recommandations pour l'amélioration de la maîtrise du risque (saisine n°2009-SA-0044). (<http://www.anses.fr/Documents/MIC2009sa0044-2.pdf>)
- Anses (2011). Avis relatif à l'évaluation du risque lié à la réouverture d'une zone conchylicole fermée pour cause de présence avérée de calicivirus (norovirus et sapovirus) dans les coquillages vivants (Saisine n° 2011-SA-0022).
- Anses (2012). Rapport relatif à la demande d'évaluation du risque lié à *Vibrio parahaemolyticus* via la consommation de produits de la mer (Saisine n° 2010-SA-0301).
- Crossan, C., Baker, P.J., Craft, J., Takeuchi, Y., Dalton, H.R. and Scobie, L. (2012). Hepatitis E virus genotype 3 in shellfish, United Kingdom. *Emerging Infectious Diseases*, **18**, 2085-2087.
- Maalouf, H., Pommepuy, M. and Le Guyader, F. (2010). Environmental conditions leading to shellfish contamination and related outbreaks. *Food and Environmental Virology*, **2**, 136-145.
- Rapport du LR-UE (2012). Report of the EU-RL regarding possible harmonisation of EU and Codex microbiological standards for live bivalve molluscs. 25 pages.
- Thébault, A., Le Saux, J.C., Pommepuy, M., Le Guyader, S., Lailler, R. and Denis, J.B. (2012). Quantitative approach of risk management strategies for hepatitis A virus contaminated oyster production areas. *Journal of food protection*, **75**, 1249-1257.
- Thomas, A., J. C. Le Saux, et al. (2011). Norovirus and oysters: From land to sea. *Virologie*, **15**, 353-360.
- Vaillant, V., Jourdan-Da-Silva, N., Quilici, M.L., Couturier, E., Le Guyader, S., Delmas, G. and Le Saux, J.C. (2012). Surveillance des risques biologiques liés à la consommation de coquillages en France. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire INVS*, 2012-05-09, Hors Série, 34-37.
- WHO (2010). Safe management of shellfish and harvest waters. Rees, G., Kay, D., Bartram, J. and Santo, J. Domingo, ed. (London, UK, IWA Publishing).

## ANNEXE(S)

- Annexe 1 : Différences et interprétations des plans d'échantillonnage à deux et trois classes
- Annexe 2 : Extraits de rapports Anses relatifs au dispositif de surveillance
- Annexe 3 : Extraits de rapports Afssa relatifs aux critères envisagés pour évaluer la sévérité d'une situation d'alerte

**Annexe 1 : Différences et interprétations des plans d'échantillonnage à deux et trois classes**

Plan à 2 classes :



Plan à 3 classes :



avec :

- $n$ , le nombre d'unités constituant l'échantillon
- $c$ , le nombre maximum de résultats pouvant présenter des valeurs comprises entre  $m$  et  $M$ , pour le nombre d'échantillon  $n$  réalisé.
- $m$ , la concentration maximale en microorganismes pour laquelle les unités sont de qualité satisfaisante
- $M$ , la concentration maximale en microorganismes pour laquelle les unités sont de qualité acceptable (uniquement pour le plan à trois classes).

Ainsi :

- Le règlement (CE) n°2073/2005 fixe le contrôle du critère microbiologique *E. coli* dans les coquillages sur la base d'un plan à deux classes avec  $n=1$ ,  $c=0$ ,  $m=230$  *E. coli*/100g de CLI.

Le produit est conforme lorsque l'échantillon présente une concentration inférieure ou égale à 230 *E. coli*/100g de CLI.

- Le Codex alimentarius fixe le contrôle du critère microbiologique *E. coli* dans les coquillages sur la base d'un plan à trois classes avec  $n=5$ ,  $c=1$ ,  $m=230$  *E. coli*/100g de CLI,  $M=700$  *E. coli*/100g de CLI.

Le produit est conforme lorsque, sur la base d'un jeu de 5 échantillons, 4 échantillons minimum présentent des concentrations inférieures ou égales à 230 *E. coli*/100g de CLI, et avec la possibilité qu'un échantillon présente une concentration comprise entre 230 et 700 *E. coli*/100g de CLI.

## **Annexe 2 : Extraits de rapports Anses relatifs au dispositif de surveillance**

Extraits du rapport Anses (2010) : Contamination de coquillages marins par le virus de l'hépatite A, recommandations pour l'amélioration de la maîtrise du risque (saisine n°2009-SA-0044) :

« Deux épidémies d'hépatite A liées à la consommation d'huîtres provenant de la baie de Paimpol sont survenues au cours de l'hiver 1999-2000 et de l'été 2007. La baie de Paimpol, héberge 500 hectares de culture d'huîtres. Ces dernières y sont élevées soit pour une consommation locale, soit pour être affinées dans d'autres secteurs ostréicoles français. Cette baie est caractérisée par une faible profondeur d'eau, des fonds plats et une forte amplitude de marée qui entraînent un découverture des surfaces (et des concessions d'élevage) à marée basse. Plusieurs dizaines d'exutoires et d'émissaires de cours d'eau ou de réseau pluvial sont répartis sur tout le pourtour de la baie. Les eaux usées du bassin versant sont traitées par trois stations d'épuration, plus ou moins bien dimensionnées, mais certaines zones littorales sont équipées d'assainissement autonome. Lors de certains événements météorologiques, ces émissaires peuvent rejeter des eaux de qualité moyennes qui peuvent impacter directement les parcs ou les zones de dépôts de coquillages (situées sur l'estran). La surveillance bactériologique REMI des concessions d'élevage reflète cette fragilité de la contamination puisque la zone de production est classée en B, et les coquillages doivent passer dans des structures de purification avant la vente au consommateur. De plus, la surveillance ponctuelle de VHA en 2008 et 2009 a révélé neuf épisodes de contamination des coquillages. Ce site comme d'autres zones de productions d'huîtres situées près de la côte est soumis à la pression urbaine. »

Epidémie de VHA l'hiver 1999 à Paimpol :

« La surveillance bactériologique du réseau REMI n'avait pas mis en évidence de dépassement de norme sur la période incriminée mais aucun point de prélèvement ne se trouvait dans la zone suspectée (...). L'origine la plus probable des huîtres contaminées était des bassins de stockage des ostréiculteurs situés sur la côte nord du bassin de Paimpol. »

Epidémie de VHA de l'été 2007 à Paimpol :

« Les concentrations maximales en *E. coli* pour les mois de juin, juillet et août sur les stations REMI de la Baie de Paimpol et Ploubazlanec restaient cohérentes avec le classement sanitaire des zones de production.

Ces deux épidémies, survenues à moins de 9 ans d'intervalle à des périodes différentes de l'année ont en commun une contamination limitée dans le temps et dans l'espace des huîtres de la baie, l'absence de contamination importante en *E. coli* de cette zone par la surveillance REMI (les virus ne sont pas recherchés par le REMI, le règlement demandant seulement la recherche d'*E. coli*), et l'absence de mise en évidence du VHA dans les prélèvements d'huîtres lors des investigations qui ont suivi la survenue des cas (soit environ 2 mois après la contamination supposée des coquillages). L'origine des deux épisodes de contamination n'a pas pu être identifiée précisément ; les hypothèses sur cette origine sont cependant similaires. »

« Un des points majeurs qui ressort de l'étude des épidémies liées aux coquillages est l'absence de relation entre l'indicateur de contamination fécale (soit *E. coli*, soit coliformes fécaux) et la présence de virus entériques humains et, de ce fait, la grande difficulté de prévenir le risque à partir des surveillances microbiologiques classiques (Butt, et al. 2004; Lees 2000). En effet, le niveau d'*E. coli* est la plupart du temps conforme à la réglementation européenne dans des cas de gastroentérites ou d'épidémies d'hépatite A

*liées à la consommation de coquillages (Bosch et al., 2001; Boxman et al. 2006; Le Guyader et al. 2006; Le Guyader et al. 2003). Par ailleurs des cas liés à des huîtres ayant séjourné en bassin d'épuration avant consommation ont été observés (Grohmann et al. 1980; Le Guyader et al. 2006) confirmant que ces systèmes permettent l'élimination naturelle rapide d'E. coli, tandis que celle des virus reste difficile. Aussi les deux jours de purification tels qu'anciennement préconisés par la réglementation nationale sont-ils inefficaces, en cas de contamination virale, pour obtenir un coquillage sain prêt à être consommé cru (Loisy et al. 2005; Schwab et al. 1998). »*

Extraits du rapport Anses (2011) : Evaluation du risque lié à la reouverture d'une zone conchylicole fermée pour cause de présence avérée de calicivirus (norovirus et sapovirus) dans les coquillages vivants (saisine n°2011-SA-0022) :

*« La conformité des produits et des procédés de conchyliculture s'appuie aujourd'hui sur un système de surveillance de la contamination bactérienne. Des critères de qualité basés sur la recherche d'Escherichia coli sont fixés par la directive 2006/113/CE1. Cette même directive exige la réalisation de profils de vulnérabilité pour chaque zone de production conchylicole. Ce système de surveillance de la contamination bactérienne ne permet pas de conclure sur la présence d'une contamination virale, du fait de l'absence de corrélation entre la présence du virus et celle de l'indicateur bactérien.*

*Les épisodes de contamination virale les plus importants avec de nombreuses TIAC à virus entériques (le plus souvent à norovirus) ont eu lieu en 2002/2003, 2005/2006, 2009 et en 2010/2011. Ces épisodes ont fait l'objet d'investigations approfondies épidémiologiques, microbiologiques et environnementales. Ils ont en commun d'être survenus lors de l'épidémie hivernale de gastro-entérite virale, après des épisodes de fortes précipitations et d'être liés à une contamination par plusieurs virus entériques. Ils ont également mis en évidence les limites de la surveillance basée sur l'indicateur de contamination fécale Escherichia coli qui n'a pas permis de détecter la contamination virale. »*

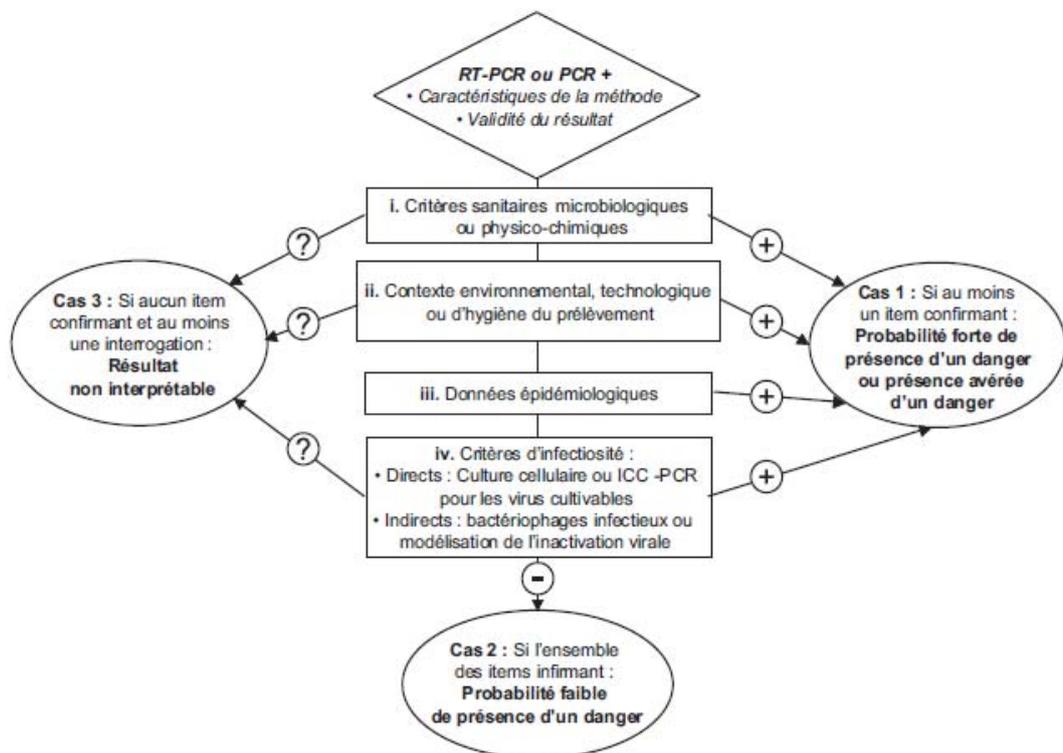
**Annexe 3 : Extraits de rapports Afssa relatifs aux critères envisagés pour évaluer la sévérité d'une situation d'alerte**

Extraits du rapport Afssa (2007) : Bilan des connaissances relatives aux virus transmissibles à l'homme par voie orale :

« La constatation d'un génome de virus ne permet pas de témoigner de son caractère infectieux, critère majeur pour les gestionnaires du risque. Dans ce cadre, le groupe de travail a élaboré un logigramme d'interprétation d'un résultat positif, outil pratique et concret, dont il recommande l'utilisation par les gestionnaires du risque. À l'inverse, dans un échantillon considéré, l'absence de génome viral est relativement informative puisque dans les conditions d'assurance qualité adaptées, elle est synonyme de l'absence de virus infectieux.

La recherche de virus par les techniques de biologie moléculaire, en association avec d'autres indicateurs (bactériens ou phagiques) ou des données environnementales pourrait améliorer l'appréciation des risques sanitaires liés aux virus pathogènes dans les denrées alimentaires et l'eau. Néanmoins, il serait utile d'approfondir les recherches sur les indicateurs afin d'identifier, pour chaque type de matrice, le ou les indicateur(s) qui serai(en)t les plus judicieux ».

Figure 4 : logigramme d'interprétation d'un résultat positif par les techniques de biologie moléculaire



« La réflexion sur la signification de la présence de génome viral dans l'eau et les aliments en terme d'infectiosité potentielle met en évidence la difficulté d'interprétation d'un résultat positif obtenu avec des méthodes de biologie moléculaire. Il est donc apparu nécessaire d'élaborer un logigramme d'interprétation de ce résultat positif, qui sera un outil pratique et concret pour les gestionnaires du risque.

Ce logigramme fournit donc des recommandations pour l'interprétation d'un résultat de RT-PCR ou de PCR positif lors d'une recherche de génomes (ARN ou ADN) de virus

entériques pathogènes de l'homme, dans des matrices alimentaires ou dans l'eau de consommation (représentation synoptique en Figure 4).

Afin d'évaluer l'aptitude de la méthode à fournir un résultat fiable et représentatif, il est nécessaire de préciser les caractéristiques de la méthode de détection et de fournir des informations permettant d'exclure l'hypothèse d'un faux positif (liste des informations demandées en Tableau 13). Ces éléments peuvent également contribuer à apprécier l'exposition des consommateurs, en analysant des prélèvements du même lot, voire d'autres lots ou des prélèvements issus de producteurs différents pouvant être sous l'influence de facteurs environnementaux communs. »

« A. Éléments complémentaires à renseigner (items)

Des compléments d'analyse et les enquêtes, permettant l'appréciation du risque infectieux, doivent être conduits simultanément sans attendre d'obtenir un résultat par l'une ou l'autre des approches. La conclusion d'une présence d'un danger infectieux est possible à chaque étape et de façon indépendante :

i. Vérifier le respect (ou non) aux critères réglementaires (microbiologiques et physico-chimiques) pouvant indiquer une contamination microbienne récente.

ii. Rechercher des facteurs environnementaux ou technologiques ou encore d'hygiène pouvant indiquer l'origine de la contamination virale de l'aliment ou de l'eau, sa date et éventuellement la durée d'exposition des denrées (ou de l'eau) aux virus (L'ensemble des points critiques précisés en Tableau 14 doit être pris en compte pour pouvoir statuer sur ce point).

iii. La prise en compte des données épidémiologiques disponibles (par exemple : foyers épidémiques dans les populations exposées aux aliments ou à l'eau, déclarations d'infection récente chez les préparateurs...) peut également permettre de caractériser le danger (Tableau 15).

iv. Afin d'apprécier la probabilité de présence de virus infectieux et donc d'un danger, rechercher la présence, dans les lots positifs par RT-PCR (ou PCR pour les virus à ADN), de virus entériques infectieux (principalement les entérovirus, éventuellement les réovirus, rotavirus, adénovirus, astrovirus, virus de l'hépatite A ; voire les norovirus, sapovirus et virus de l'hépatite E si des modèles cellulaires deviennent disponibles). Une caractérisation indirecte du maintien du pouvoir infectieux des virus est possible, en démontrant la présence de bactériophages infectieux (ARN F-spécifiques et/ou somatiques). Si une analyse de type HACCP montre la maîtrise des points critiques et l'arrêt de la source de contamination, alors y opposer des modèles de survie des virus dans la matrice alimentaire (ou l'eau) afin d'apprécier la persistance de virus infectieux ou l'effet de traitements hygiénisants (exemples : désinfection, cuisson...). »

« B. Interprétation des résultats complémentaires obtenus

Cas 1 : Si au moins l'un de ces items fournit des arguments en faveur d'une contamination microbienne récente ou démontre le caractère infectieux du virus incriminé, alors il peut être conclu à une probabilité forte de présence d'un danger ou à la présence avérée d'un danger.

Cas 2 : Si l'ensemble de ces items fournit des arguments en faveur de l'absence d'une contamination récente et du pouvoir infectieux du virus incriminé, il est possible de conclure à une probabilité apparemment faible de présence d'un danger.

Cas 3 : Si une interrogation subsiste sur les items i. (critères sanitaires microbiologiques ou physico-chimiques), ii. (contexte environnemental, technologique ou d'hygiène du prélèvement) ou iv. (critères d'infectiosité directs ou indirects) et qu'aucun des items ne fournit d'arguments en faveur d'une contamination récente, alors le résultat positif de RT-PCR ou de PCR n'est pas interprétable quant à la présence d'un danger. Néanmoins, dans ce cas, la surveillance des denrées (ou de l'eau) et des procédés de production doit être accrue pendant la durée qui sera nécessaire pour démontrer la maîtrise durable des éventuelles sources de contamination microbienne.

*NB : cas particulier : lorsque les items i., ii. et iv. concluent à la probabilité faible de présence d'un danger, en l'absence de données épidémiologiques interprétables (item iii.), il est néanmoins possible de conclure à une probabilité apparemment faible de présence d'un danger (cas 2).*

*En effet, des données épidémiologiques peuvent, dans certaines situations, témoigner de la probabilité forte (« + ») de la présence d'un danger (par exemple, survenue de cas groupés d'une maladie, associés à l'exposition à un vecteur de transmission faisant l'objet d'un résultat positif par les techniques de biologie moléculaire).*

*Dans d'autres situations, elles peuvent témoigner d'une probabilité faible (« - ») de présence d'un danger (par exemple, absence de mise en évidence de cas associés au vecteur). Toutefois, les données épidémiologiques ne permettent pas toujours de conclure : faible puissance pour mettre en évidence des associations, etc. En outre, les données épidémiologiques sont fréquemment indisponibles du fait de la difficulté de recueil liée au caractère rétrospectif des investigations, à l'absence de confirmation des infections, etc. »*

Ce qu'on entend par caractéristiques de la méthode – liste des données à renseigner - est donné dans le tableau ci-dessous :

• Références bibliographiques, voire normatives de la méthode
• Principe de la méthode de concentration et de purification des virus
• Principe de la méthode d'extraction des acides nucléiques
• Proportion d'échantillons analysés et éventuellement rendement de récupération des génomes viraux
• Principe de la méthode de détection
• Séquences des amorces et de la sonde
• Températures d'hybridation (éventuellement concentration en MgCl <sub>2</sub> )
• Méthode de confirmation (hybridation ou séquençage)
• Nature et résultats des contrôles positifs et négatifs
• Contexte analytique : identification des prélèvements (numéro de lot, date et lieu du prélèvement), nombre de prélèvements effectués (nombre de répétitions), nombre de résultats positifs et négatifs
• Résultats du séquençage

Ce qu'on entend par « contexte environnemental, technologique ou d'hygiène du prélèvement » est donné dans le tableau ci-dessous :

Ensemble des points critiques à prendre en compte pour évaluer le contexte du prélèvement	Coquillages crus	Autres aliments	Eau de boisson
Classement de la zone de production et de stockage	X		
Qualité des ressources en eau de boisson, agricole ou industrielle	X	X	X
Vulnérabilité de la ressource vis-à-vis d'une contamination fécale (proximité d'un émissaire d'eau usée ou d'une station d'épuration des eaux usées, épandage de boues résiduelles non traitées ou de lisiers insuffisamment fermentés...)	X	X	X
Facteurs climatiques (fortes précipitations, inondations)	X	X	X
Facteurs anthropomorphiques (population accrue sur un bassin versant, sur une zone côtière, actions de malveillance...)	X	X	X
Non respect des bonnes pratiques hygiéniques, accident dans le processus de production, de transformation ou de distribution	X	X	X
Nature du traitement de production, du lavage, de la désinfection voire du processus industriel	X	X	X
Température du prélèvement, concentration en chlore...	X	X	X
Résultats de surveillance par l'exploitant	X	X	X

X : Données à renseigner

Ce qu'on entend par « données épidémiologiques » est donné dans le tableau ci-dessous :

<ul style="list-style-type: none"><li>■ <b>Malades associés à la consommation d'aliments ou d'eau :</b><ul style="list-style-type: none"><li>• Nombre de personnes exposées, de malades</li><li>• Date d'apparition des premiers signes cliniques</li><li>• Durée d'incubation</li><li>• Signes cliniques (hépatites, gastroentérites ou autres)</li><li>• Durée des signes cliniques</li><li>• Prélèvements cliniques analysés (éventuellement résultats de ces analyses)</li></ul></li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>■ <b>Malades dans le personnel de la chaîne de production, de transformation ou de distribution :</b><ul style="list-style-type: none"><li>• Nombre de personnes malades</li><li>• Date d'apparition des premiers signes cliniques</li><li>• Signes cliniques (hépatites, gastroentérites ou autres)</li><li>• Durée des signes cliniques</li><li>• Dates de l'arrêt et éventuellement de la reprise de travail</li><li>• Prélèvements cliniques analysés (éventuellement résultats de ces analyses)</li></ul></li></ul>