MINISTÈRE
DE L'AGRICULTURE
ET DE LA SOUVERAINETÉ
ALIMENTAIRE
Liberté
Égalité
Fraternité

Ordre de méthode

Direction générale de l'alimentation **Service des actions sanitaires** **Sous-direction de la sécurité sanitaire des aliments** **Bureau des produits de la mer et d'eau douce** **251 rue de Vaugirard** **75 732 PARIS CEDEX 15** **0149554955**	**Instruction technique** **DGAL/SDSSA/2023-117** **13/02/2023**

Date de mise en application : Immédiate
Diffusion : Tout public

Cette instruction abroge :
DGAL/SDSSA/2019-486 du 03/07/2019 : Jugement de conformité des lots de produits de la pêche et de coquillages vivants trouvés contaminés par des Vibrio suite à des contrôles officiels (version modifiée de l'IT 2014-487)
Cette instruction ne modifie aucune instruction.
Nombre d'annexes : 2

Objet : Jugement de conformité des lots de produits de la pêche et de coquillages vivants contaminés par des Vibrio suite à des contrôles officiels

Destinataires d'exécution
Postes de Contrôles Forntaliers (PCF - PIF) DD(ETS)PP DAAF DRAAF

Résumé : Il s'agit d'une mise à jour de l'instruction précédente, au regard :
- des laboratoires pouvant réaliser les analyses
- des modalités de gestion des lots contaminés

Textes de référence :Règlement (CE) n°2073/2005

Les bactéries du genre *Vibrio*, ubiquitaires des milieux marins et estuariens, se développent préférentiellement dans les eaux chaudes et salées. Elles peuvent donc se retrouver dans certains produits de la pêche ou dans certains coquillages vivants et potentiellement induire des infections gastro-intestinales et des septicémies chez l'Homme.

I - Contexte et champ de la note

La réglementation européenne ne prévoit pas la recherche des vibrions pathogènes pour l'Homme dans les aliments et **il n'existe pas de critère réglementaire spécifique des vibrions**. Certaines espèces de *Vibrio* présentes dans les coquillages vivants et les produits de la pêche (en particulier les crustacés) sont responsables d'intoxications alimentaires et il convient donc de définir des mesures de gestion spécifiques, proportionnées et harmonisées au niveau national afin de gérer le risque lié à la présence de *Vibrio* spp.

La présente note a pour objet de définir les critères de jugement de conformité d'un lot de coquillages vivants ou de produits de la pêche trouvés contaminés par des *Vibrio* spp à la suite des contrôles officiels, et notamment :

- **à l'importation** dans le cadre du plan de surveillance de la contamination biologique et physico-chimique des produits d'origine animale destinés à la consommation humaine ou animale présentés en poste d'inspection frontalier, sur les produits ne devant

- **dans le cadre d'investigation de toxi-infection alimentaire** dès lors que la symptomatologie laisse penser qu'une espèce de *Vibrio* pathogène puisse en être à l'origine.

L'annexe I présente un état des connaissances sur les *Vibrio* spp. d'intérêt en santé publique.
Les modifications apportées dans la présente instruction technique par rapport à celle de 2014 (instruction DGAL/SDSSA/2014-487 abrogée) sont surlignées en jaune.

II - Conduite à tenir et mesures à appliquer lors des contrôles officiels

II. A - Laboratoires destinataires des prélèvements

Tout prélèvement pour analyse officielle de *Vibrio* spp. doit être adressé au Laboratoire National de Référence (LNR) :

- **pour la recherche des *Vibrio* spp. dans les produits de la pêche[1] :**

    - **Analyse officielle de première intention et de confirmation**

    ANSES – Laboratoire de sécurité des aliments – Site de Boulogne sur mer, LNR *Vibrio* dans les produits de la pêche, Boulevard du Bassin Napoléon, 62200 Boulogne sur mer
    Tél : 03 21 99 25 00/ Contact : Stéphanie COPIN/ Mail : stephanie.copin@anses.fr

    - En cas de saturation du LNR Vibrio dans les produits de la pêche pour la réalisation d'analyses de première intention, le LDA 76 prendra en charge une partie des prélèvements pour lui apporter un soutien analytique. Concrètement, à partir du 2ème échantillon par

1 Produits de la pêche : tous les animaux marins ou d'eau douce (à l'exception des mollusques bivalves, des échinodermes vivants, des tuniciers vivants et des gastéropodes marins vivants et de tous les mammifères marins, reptiles et grenouilles), sauvages ou d'élevage, y compris toutes les formes et parties comestibles de ces animaux (annexe I point 3.1 du règlement (CE) n° 853/2004).

semaine, tout poste de contrôle frontalier confondu, le LDA prendra en charge les prélèvements pour apporter un soutien analytique au LNR, **conformément aux modalités et méthode prévues en annexe 3**.

- Afin de vérifier la disponibilité du LNR il faut, avant tout envoi, le contacter (coordonnées ci-dessus) et si besoin réorienter l'échantillon à analyser vers le LDA 76 (à avertir au préalable).

LDA 76 – 9 avenue du Grand cours, 76175 ROUEN cedex
Tél : 02 35 03 50 35/ Contact : Valérie BUTEAU/ Mail : valerie.buteau@seinemaritime.fr

En cas de détection, le LDA enverra au LNR pour confirmation de la présence de souches pathogènes.

- **pour la recherche des *Vibrio* spp. Dans les coquillages vivants :**

IFREMER – Laboratoire Santé, Environnement et Microbiologie, LNR Microbiologie des coquillages, rue de l'Ile d'Yeu, BP 21105, 44311 Nantes cedex 03
Tél : 02 40 37 40 37 – 02 98 22 43 49 / contact : Pascal GARRY / Dominique HERVIO-HEATH
Mail: lsem@ifremer.fr

La méthode d'analyse est celle décrite dans la norme NF EN ISO 21872-1 (2017)2, méthode de recherche par PCR de l'identification de l'espèce *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* et *V. vulnificus* et le cas échéant, recherche par PCR des gènes codant pour les hémolysines TDH et TRH de *V. parahaemolyticus*. Il n'existe actuellement aucune méthode de quantification normalisée.

II. B – Echantillonnage et critères de conformité

Le tableau ci-dessous, rappelle les espèces de *Vibrio* spp. réputés pathogènes, susceptibles de conduire à un résultat non conforme.

Espèces de *Vibrio* spp. réputés pathogènes	Matrice alimentaire	Plan d'échantillonnage	Limite	Méthode
Vibrio cholerae *O1 ou O139* ***Vibrio cholerae*** non-O1 ou non-O139 mais possédant le gène CTX codant pour la toxine cholérique	Produits de la pêche et coquillages vivants	n=5 (*) c=0	Absence dans 25g de chair et liquide intervalvaire pour les coquillages 3(*) ou Absence dans 25 g Absence dans 25g de chair pour les produits de la pêche 4(*)	Norme NF EN ISO 21872-1 en vigueur
Vibrio parahaemolyticus possédant au moins un des génes d'hémolysine (TDH+ ou TRH+ ou TDH+/TRH+)				
Vibrio vulnificus				

(*) En cas de TIAC, l'analyse sera adaptée au nombre et à la taille de l'échantillon restant.

Pour que l'échantillon soit conforme, aucune des 5 unités de prélèvement, analysée chacune séparément, ne doit montrer la présence de *Vibrio* spp. réputés pathogènes((n=5 et c=0). En cas de TIAC, le nombre d'unités de prélèvement sera adapté à la disponibilité du lot incriminé (n=1 à 5) et à la quantité d'échantillon restante.

2 Norme internationale remise à jour en 2017 : ajout des techniques de biologie moléculaire concernant *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* et *Vibrio vulnificus*
3 Soit un minimum de 12 huîtres; 30-40 moules et coques ; 20-30 palourdes.
4 Produits de la pêche à décortiquer type crustacés entiers et les poissons entiers.

II.C – Décisions sur les lots

L'annexe II présente le tableau récapitulatif des critères de jugement de conformité d'un lot de produits de la pêche ou de coquillages vivants trouvés contaminés par des Vibrio spp. à la suite des contrôles officiels.

- **Les lots non conformes** doivent être retirés du marché, identifiés en tant que sous-produits animaux de catégorie 2[5] dans les meilleurs délais et traités comme tels conformément à l'article 13 du règlement (CE) n°1069/2009. Néanmoins, conformément au règlement (CE) n°2073/2005 (article 7, paragraphe 2), un traitement assainissant pourra être effectué dans les conditions suivantes :
    - Les produits sont initialement crus, destinés au consommateur final, et n'ont pas atteint le commerce de détail ;
    - L'opérateur peut justifier, à la satisfaction de l'autorité compétente, que le traitement assainissant est efficace au regard du risque *Vibrio* spp (étude technique, analyses libératoire sur un lot initialement contaminé, …).

- **Un rappel de produits et leur destruction** trouvés contaminés par des *Vibrio* spp sera demandé si les produits ont atteint le commerce de détail.

- **L'espèce *Vibrio vulnificus*** étant associée à des maladies non-intestinales telle que la septicémie (souvent mortelle), il est recommandé d'être extrêmement vigilent lors de la manipulation des lots contaminés.

- Les lots contaminés par *V. alginolyticus*, *V. fluvialis, V. mimicus, V. carchariae, V. metschnikovii, V. furnissii, V. cincinnatiensis,V* ou par d'autres vibrions dont les espèces ne sont pas identifiées, peuvent être mis sur le marché.

Les éléments de la présente instruction seront inclus dans le guide de gestion des alertes (Annexe IV, point 2- Seuils d'alerte) lors de sa mise à jour.

Je vous saurais gré de m'informer des difficultés éventuellement rencontrées dans l'application de cette instruction.

La directrice générale adjointe de l'alimentation

Emmanuelle SOUBEYRAN

5 Conformément à l'article 14 du règlement (CE) n° 178/2002 et à l'article 9 (h) du règlement (CE) n°1069/2009.

Annexe I

Les *Vibrio* spp. d'intérêt en santé publique

Par le monde, la majorité des intoxications alimentaires à *Vibrio* spp. liées à la consommation de produits de la mer est causée par *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae*, ou *Vibrio vulnificus*.

Vibrio parahaemolyticus et *Vibrio cholerae* ont été isolés dans des cas de gastroentérite faisant suite à la consommation d'aliments contaminés.

Vibrio cholerae a également été responsable d'intoxication par l'ingestion d'eau contaminée. Cette espèce peut être à l'origine d'infections extra intestinales; des cas de septicémies primaires faisant suite à l'ingestion d'aliments contaminés ont également été rapportés. Entre 1995 et 2016, 78% des cas français d'infections alimentaire à *V. cholerae* non-O1/non-O139 dont le CNR a eu connaissance ont été contractés à l'étranger. Ils étaient liés à la consommation de produits de la mer ou de fruits ou crudités contaminés par les eaux usées d'origine domestique utilisées comme eaux d'irrigation.

Enfin, la contamination par *Vibrio vulnificus* par voie digestive associée à la consommation de produits de la pêche et de coquillages a été documentée dans certaines parties du monde (Etats-Unis, Nouvelle-Calédonie, Japon et Asie du Sud Est), mais pas en Europe. Aux Etats-Unis, une centaine de cas sont rapportés chaque année, 90% d'entre eux étant associés à la consommation d'huîtres crues. De plus, l'espèce *V. vulnificus* y est la principale cause de décès liée à la consommation de fruits de mer.

Plusieurs avis scientifiques relatifs à l'évaluation des risques liés à la présence de *Vibrio* spp. dans les produits de la pêche ont été rendus :

- d'une part, par l'Anses[6],
- d'autre part, par les experts de la FAO (Organisation des Nations Unies pour l'agriculture et l'alimentation) et de l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé)[7].

Il est intéressant de noter les combinaisons "pathogène-denrée" les plus fréquemment rapportées dans la littérature ou au travers des informations ou des alertes (ou rejets à la frontière) indiquées dans le Système d'Alerte Rapide pour les Denrées Alimentaires et les Aliments pour Animaux (RASFF).

Ainsi, quarante notifications liées à la présence de *Vibrio* spp. dans les produits de la mer ont été enregistrées entre 2010 et 2018 :

- *Vibrio parahaemolyticus* dans les coquillages et les crustacés (plus rarement les poissons),
- *Vibrio cholerae* dans les crustacés et en particulier les crevettes des eaux chaudes dans le cadre du commerce international,
- la présence de *Vibrio vulnificus* n'a été rapportée que cinq fois par le RASFF entre 2010 et 2018, chaque fois dans des crevettes en provenance d'Asie.

6 Anses (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail). Fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments, Anses 2012 (mise à jour prévue en 2019 ; www.anses.fr)

7 Evaluation des risques pour *Campylobacter* spp. dans les poulets et pour *Vibrio* spp. dans les produits de la pêche. Rapport d'une consultation mixte FAO/OMS d'experts, Bangkok, Thaïlande 5-9 août 2002. Risk Assessment of *Vibrio Parahaemolyticus* in Seafood : Interpretative summary and technical report, Microbiological Risk Assessment Series, n°16, 2011.

Vibrio parahaemolyticus

Comme tous les *Vibrio* spp., cette bactérie est présente dans les différents compartiments du milieu marin. Les produits de la mer (coquillages, crustacés, poissons) crus ou insuffisamment cuits sont les principaux vecteurs de transmission des *Vibrio parahaemolyticus* à l'homme.

Vibrio parahaemolyticus est une cause fréquente de maladies gastro-intestinales dans le monde. C'est en Asie et aux Etats-Unis que l'incidence des infections est la mieux documentée ; peu de données existent en Europe. Les symptômes associés sont des douleurs abdominales, crampes, diarrhées aqueuses, nausées, vomissements parfois accompagnés de fièvre. Le délai de survenue des symptômes est de 12 à 24 heures après ingestion, mais il peut varier entre 4 et 96 heures. Exceptionnellement, cette espèce provoque chez l'Homme des septicémies chez des sujets immunodéprimés.

La grande majorité des souches isolées chez des patients atteints de diarrhée produit au moins une des deux hémolysines, TDH (thermostable direct hemolysin) ou TRH (TDH-related hemolysin), parfois les deux.

Ainsi, ce sont les souches de *Vibrio parahaemolyticus* possédant au moins un des deux gènes TDH ou TRH, codant les hémolysines thermostables TDH et TRH, qui sont considérées comme pathogènes pour l'homme et qui justifient donc que soient prises des mesures de gestion des lots contaminés.

Il convient de souligner que **ces toxines ne sont pas préformées dans les aliments.** En effet, les experts FAO/OMS estiment que la maladie est causée par la toxine mais seulement si celle-ci est produite dans l'intestin suite à la colonisation par une souche produisant TDH et/ou TRH.

Enfin, le risque de contamination des coquillages par *V. parahaemolyticus* est accru pendant les mois d'été. En effet, les densités les plus élevées de germes se rencontrent dans les eaux de température supérieure à 18-20°C : des pics de concentration de ce germe ubiquitaire et marin peuvent donc être observés durant les mois les plus chauds, même dans les eaux littorales de France métropolitaine. *V. parahaemolyticus* peut ainsi être utilement recherché dans les coquillages (en particulier les huîtres, car consommées crues) dans le cas de TIAC d'origine locale pendant les mois d'été.

Vibrio cholerae

Les souches appartenant aux sérogroupes O1 et O139 possèdent généralement le gène CTX et produisent la toxine cholérique (CT). Ces souches provoquent les épidémies de choléra. Les épidémies sont limitées principalement aux pays en développement à climat chaud. La contamination des milieux de production d'aliments (y compris les bassins d'aquaculture) par les fèces de personnes atteintes de choléra pourrait contribuer à introduire indirectement le vibrion cholérique dans les aliments. Ainsi, tous les produits de la pêche, crus ou cuits, peuvent être concernés dès lors qu'ils proviennent de régions du monde où le choléra est endémique ou épidémique.

En l'état actuel des connaissances, on estime que les souches de *Vibrio cholerae* non-O1 et non-O139 ne sont pas pathogènes par voie alimentaire, sauf celles qui possèderaient les gènes de la toxine cholérique. Ces dernières souches présenteraient en effet un risque pour la santé publique (gastro-entérites principalement).

Ainsi, les souches de *Vibrio cholerae* appartenant aux sérogroupes O1 ou O139 et de *Vibrio cholerae* non-O1 et non-O139 mais qui possèdent les gènes de la toxine cholérique présentent un niveau de risque par voie alimentaire justifiant des mesures de gestion des lots contaminés.

Vibrio vulnificus

Vibrio vulnificus colonise préférentiellement les eaux peu salées et chaudes. Cette bactérie est responsable des infections d'origine alimentaire les plus graves avec un taux de létalité supérieur à 50% pour les formes septicémiques. La contamination par *V. vulnificus* par voie digestive associée à la consommation de produits de la pêche et de coquillages a été documentée aux Etats-Unis et en Asie.

Ce *Vibrio* peut être une source d'infection soit par contact direct de l'eau de mer contaminée avec une plaie ouverte, soit après blessure de la peau par un crustacé ou un poisson présentant des piquants, entraînant l'inoculation du germe puis la contamination au reste de l'organisme, soit encore par ingestion de la bactérie (avec un coquillage ou un crustacé contaminé cru).

Vibrio vulnificus est donc une bactérie très virulente à l'origine de différents types d'infections :

- après contact direct sur une peau lésée ou blessée : une infection nécrosante des plaies,
- après ingestion de coquillages ou de produits de la pêche crus :
  - une gastro-entérite (avec diarrhée, vomissements et douleurs abdominales),
  - une septicémie invasive (infection généralisée notamment chez les personnes immunodéprimées).

A ce jour, aucune infection à *Vibrio vulnificus* d'origine alimentaire n'a été rapportée en Europe ou en France Métropolitaine. Trois décès ont cependant été signalés en 2008 après consommation de coquillages, deux des personnes décédées ayant consommé des huîtres crues en Nouvelle-Calédonie (Cazorla *et al*., 2011).

Ainsi, les souches de *Vibrio vulnificus* isolées de produits de la pêche et de coquillages vivants présentent un niveau de risque par voie alimentaire justifiant des mesures de gestion des lots contaminés.

Annexe II

Tableau récapitulatif des critères de jugement de conformité d'un lot de produits de la pêche ou de coquillages vivants trouvés contaminés par des *Vibrio* spp. à la suite des contrôles officiels

Espèce de *Vibrio* spp		Mesures de gestion
Vibrio cholerae	appartenant aux sérogroupes O1 ou O139	Lot non conforme, retiré du marché Traitement assainissant possible sous conditions
	n'appartenant pas aux sérogroupes O1 ou O139 mais possédant le géne codant CTX pour la toxine cholérique	
	n'appartenant pas aux sérogroupes O1 ou O139 et ne possédant pas le gène codant pour la toxine cholérique	Pas de mesure de gestion
Vibrio parahaemolyticus	possédant au moins un des génes d'hémolysine (TDH+ ou TRH+ ou TDH+/TRH+)	Lot non conforme, retiré du marché Traitement assainissant possible sous conditions
	ne possédant pas les gènes d'hémolysine (TDH ou TRH)	Pas de mesure de gestion
Vibrio vulnificus		Lot non conforme, retiré du marché Traitement assainissant possible sous conditions
Autres espèces de *Vibrio*		Pas de mesure de gestion

ANNEXE 3

1. Analyse officielle de première intention pour la recherche des espèces *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* et *Vibrio vulnificus* potentiellement entéropathogènes dans les produits de la pêche

Le LDA 76 réalise les analyses officielles de première intention **s**elon la méthode NF EN ISO 21872-1 (2017), de l'ensemencement de la prise d'essai jusqu'à l'isolement des colonies qui, d'après leurs caractéristiques, peuvent être considérées comme des isolats potentiels de *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, et/ou *V. cholerae.*

Expression des résultats

Selon les résultats de l'interprétation, indiquer « Suspicion de *Vibrio* spp », et en complément d'information si possible, préciser le nom des espèces appropriées après avoir réalisé les essais d'identification présomptives.

Choix des colonies pour la confirmation et la préparation de cultures pures

Pour la confirmation, prélever, à partir de chaque milieu sélectif et chaque temps d'enrichissement au moins une colonie bien isolée considérée comme caractéristique ou analogue à chacune des espèces de *Vibrio* potentiellement pathogènes recherchées. Chaque souche sera repiquée sur un tube de gélose conservation et envoyée au LNR *Vibrio* spp dans les produits de la pêche (Anses, site de Boulogne sur mer) dans un système de TRIPLE EMBALLAGE pour MATIÈRE BIOLOGIQUE, CATÉGORIE B (attribuées au N° ONU 3373). Chaque souche doit être parfaitement identifiée : sa référence figure sur la fiche de demande d'analyse Anses LSA-FGE-0086 dument complétée (le formulaire est disponible sur demande auprès du LNR *Vibrio* spp). Les résultats présomptifs obtenus et les techniques d'identification peuvent être joints (Maldi tof, code de galerie API 20E…).

Remarque :

Comme indiquée dans la norme NF EN ISO 21872-1 de 2017, si le résultat de la première colonie isolée soumise à essai est négatif, il convient de soumettre à essai quatre autres colonies bien isolées. Ces souches doivent être conservées par le LDA 76 dans des conditions adéquates jusqu'à la fin de la confirmation par le LNR.

2. Confirmation des colonies suspectes

Le LNR *Vibrio* spp dans les produits de la pêche réalise la confirmation par PCR des colonies suspectes isolées par le LDA 76 pour :

- identifier les espèces *V. parahaemolyticus*, ou *V. cholerae* ou *V. vulnificus*
- rechercher la présence des facteurs de pathogénicité si nécessaire
    - les gènes de l'hémolysine thermostable directe (TDH) et l'hémolysine apparentée à la TDH (TRH) de *V. parahaemolyticus*

- les gènes de la toxine cholérique de *V. cholerae*. Une sérologie sera également réalisée pour déterminer s'il s'agit de sérogroupes O1 ou O139.

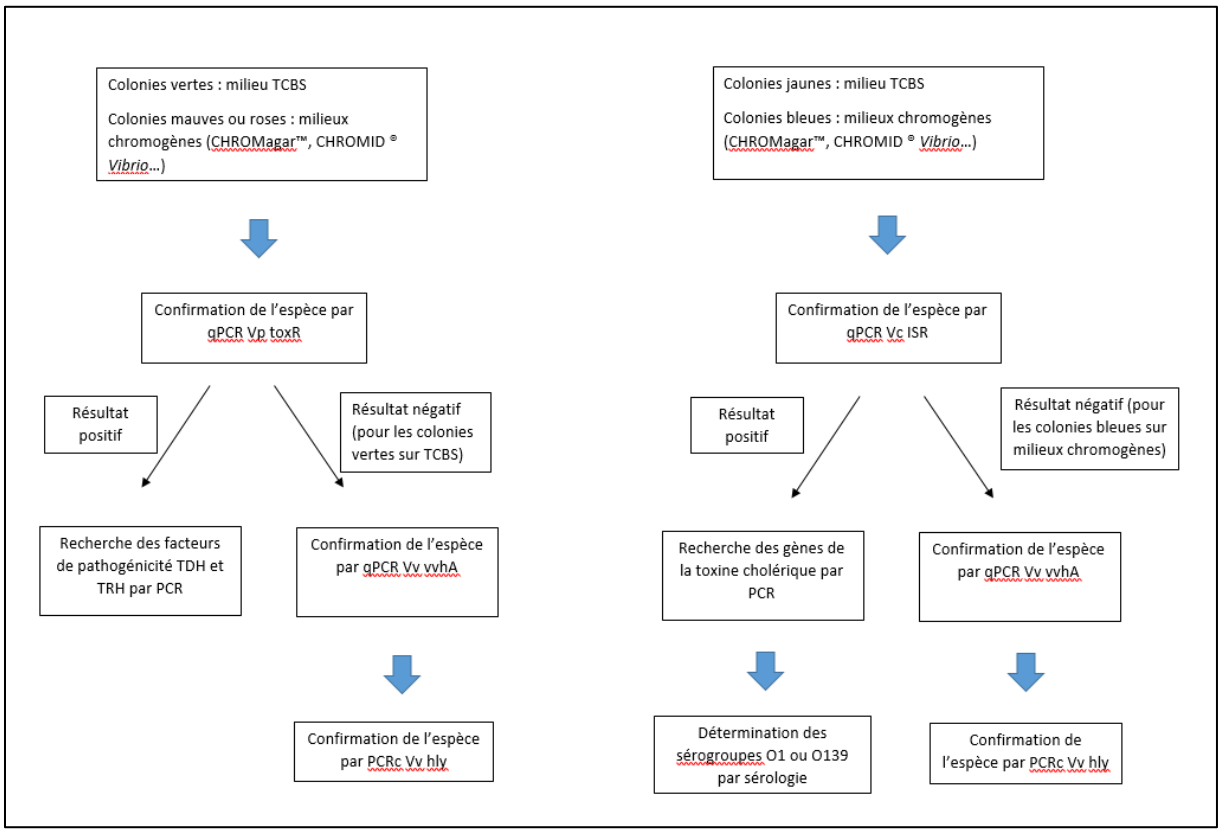
Sur le milieu sélectif TCBS, les colonies caractéristiques de :

- *V. parahaemolyticus* et de *V. vulnificus* sont vertes
- *V. cholerae* sont jaunes

Sur les milieux sélectifs chromogènes (CHROMagar™, CHROMID ® *Vibrio*…) les colonies caractéristiques de :

- *V. cholerae* et de *V. vulnificus* sont bleues
- *V. parahaemolyticus* sont mauves sur CHROMagar™ et roses sur CHROMID ® *Vibrio*

Le schéma du mode opératoire du LNR *Vibrio* spp est présenté ci-dessous :



Légende

Vp : V. parahaemolyticus ; Vc : V. cholerae ; Vv : V. vulnificus ; qPCR : PCR en temps réel