ORDRE DE METHODE

Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

MINISTERE DE L'ALIMENTATION, DE L'AGRICULTURE ET DE LA PÊCHE

Direction générale de l'alimentation
Service de la Coordination des actions sanitaires
Sous direction du pilotage et des politiques sanitaires transversales
Bureau des laboratoires et de la coordination des contrôles officiels
Adresse : 251, rue de Vaugirard
75 732 PARIS CEDEX 15
Suivi par : Denis LUCAS
Tél. : 01 49 55 58 86
Courriel institutionnel : blacco.sdppst.dgal@agriculture.gouv.fr

NOR : AGRG1013494N
Réf. Interne : MOD10.21 B 29/10/09

NOTE DE SERVICE

DGAL/SDPPST/N2010-8144

Date: 20 mai 2010

Date de mise en application :	Immédiate
Date limite de réponse :	15 juin 2010
Nombre d'annexes :	2
Degré et période de confidentialité :	Tout public

Objet : Appel à candidatures pour la constitution d'un réseau de laboratoires reconnus pour la recherche de bactéries appartenant au genre *Vibrio* (*V. splendidus* et *V. aestuarianus)* et de l'herpès virus OsHV-1 (génotype de référence et génotype µvar) chez les mollusques marins.

Références :

- **Articles L. 202-1 et R. 202-22** et suivants du code rural ;
http://www.legifrance.gouv.fr/affichCodeArticle.do;jsessionid=E75C6EE7346729126E1471A9DCEB3C5C.tpdjo12v_1?idArticle=LEGIARTI000006583031&cidTexte=LEGITEXT000006071367&dateTexte=20090602

Résumé : La présente note de service précise les conditions à respecter pour la mise en œuvre des analyses d'autocontrôles pour la recherche de bactéries appartenant au genre *Vibrio* (*V. splendidus* et *V. aestuarianus)* et de l'herpès virus OsHV-1 (génotype de référence et génotype µvar) chez les mollusques marins. Elle constitue un appel à candidatures pour la constitution d'un réseau de laboratoires reconnus pour ces recherches.

Mots-clés : Maladies des mollusques – *Vibrio* – Herpès virus - Laboratoire - reconnaissance - Analyse d'autocontrôle - Autocontrôle

Destinataires	
Pour exécution : - Directeurs des DD(CS)PP	**Pour information** : - Préfets - Laboratoires départementaux d'analyses - ADILVA - LNR : Ifremer, LGP, La Tremblade

TABLE DES MATIERES

I - Contexte de l'appel à candidatures 2
II - Détails de l'appel à candidatures 2
A - Méthodes à mettre en oeuvre 2
B - Date limite de candidatures 2
III - Critères de sélection des candidats 3
A - Généralités 3
B - Contenu des dossiers de demande de reconnaissance 3
C - Critères d'évaluation des dossiers 3
D - Obligations à respecter par les laboratoires reconnus 3
IV - Gestion des dossiers de demande de reconnaissance 4
V - Diffusion de la liste des laboratoires reconnus 4
VI - Laboratoire national de référence 5

I - Contexte de l'appel à candidatures

Les professionnels de la conchyliculture peuvent être amenés à faire des demandes d'analyses d'autocontrôles, afin de détecter la présence ou l'absence des agents infectieux recensés suivants

- bactéries appartenant au genre *Vibrio* (*V. splendidus* et *V. aestuarianus)* chez les mollusques marins ;
- herpès virus OsHV-1 et OsHV-1 microvar chez les mollusques marins.

Dans le cas où ces professionnels choisissent de réaliser ces analyses d'autocontrôles, ils doivent les faire réaliser par des laboratoires reconnus pour ces analyses.
Le présent appel à candidatures a pour objet de constituer ce réseau de laboratoires reconnus

II - Détails de l'appel à candidatures

A - Méthodes à mettre en oeuvre

Les méthodes reconnues à mettre en œuvre sont précisées dans l'annexe 2. Les laboratoires reconnus doivent maîtriser l'ensemble des méthodes listées en annexe.

B - Date limite de candidatures

Une date limite de candidature a été fixée afin de pouvoir rapidement identifier les laboratoires souhaitant s 'inscrire aux sessions organisées par le laboratoire national de référence (voir chapitre III) Cette date, une fois dépassée, n'empêchera pas la réception de nouvelles candidatures et l'étude des dossiers déposés.

III - Critères de sélection des candidats

A - Généralités

Les laboratoires candidats doivent notamment répondre aux conditions détaillées dans les articles R. 202-23 à R. 202-27 du code rural.

B - Contenu des dossiers de demande de reconnaissance

Le dossier déposé par chaque laboratoire candidat devra contenir le formulaire de demande de reconnaissance repris en annexe 1 de la présente note.

Il sera accompagné pour les laboratoires ayant déjà participé aux sessions de transfert de méthodes et de tests de recherche conjoints organisés par le laboratoire national de référence, par les attestation de participation à ces sessions.

Les laboratoires ayant déposé une candidature seront autorisés à participer aux sessions organisées par le LNR, ils ne seront toutefois reconnus qu'une fois qu'ils auront obtenu des résultats satisfaisants à ces sessions, pour l'ensemble des méthodes listées en annexe 2.

C - Critères d'évaluation des dossiers

Les laboratoires ne pourront être reconnus qu'après :

- avoir suivi une session de transfert, dispensée par le LNR, de toutes les méthodes de diagnostic concernées par cet appel,

et

- avoir obtenu des résultats satisfaisants aux essais inter-laboratoires d'aptitude organisés par le LNR, pour toutes les méthodes de diagnostic concernées par cet appel.

Dès lors qu'une accréditation sera possible pour la recherche pour la recherche de bactéries appartenant au genre Vibrio (V. splendidus et V. aestuarianus) et de l'herpès virus OsHV-1 1 (génotype de référence et OsHV-1 µvar) chez les mollusques marins, les laboratoires reconnus en seront informés par courrier individuel et auront 18 mois pour obtenir cette accréditation.

D - Obligations à respecter par les laboratoires reconnus

Les laboratoires qui seront reconnus respecteront les critères suivants :

• participation aux tests de recherche conjoints organisés par le laboratoire national de référence ;

• conservation à -20C ou - 80C pendant 1 an des ADN extraits ayant fait l'objet d'une analyse (recherche de virus et de bactéries) • chaque isolat bactérien testé par PCRq multiplex est conservé après analyse en milieu Marine Broth, Difco ou milieu de Zobell additionné de glycérol à 15% final congelé à - 80C pendant 1 an.

• envoi au LNR, sur demande de ce dernier, de ces échantillons d'ADN et isolats bactériens

• les rapports d'analyse d'autocontrôles doivent permettre l'identification :

- du demandeur ;
- de l'échantillon : nature, état, date de réception ;
- de la date d'analyse ;
- de la méthode d'analyse employée ;

- du résultat de l'analyse, avec, s'il y a lieu, les unités de mesure ;
- le cas échéant, des critères de l'interprétation des résultats.

IV - Gestion des dossiers de demande de reconnaissance

Un laboratoire qui souhaite obtenir une reconnaissance en fait la demande auprès de la direction départementale en charge de la protection des populations de son département.

Toutefois, afin d'harmoniser le traitement des dossiers, toutes les demandes de reconnaissance déposées auprès des services déconcentrés devront être réadressées, par celles-ci pour instruction auprès de :

Direction générale de l'alimentation
Service de la Coordination des actions sanitaires
Sous direction du pilotage et des politiques sanitaires transversales
Bureau des laboratoires et de la coordination des contrôles officiels
251, rue de Vaugirard
75732 Paris cedex 15.

Tout dossier adressé directement à la DGAL par un laboratoire sera toutefois traité et la DDPP concernée sera destinataire en copie du courrier de réponse à la demande de reconnaissance.

Une copie des reconnaissances délivrées sera également destinée aux DRAAF ou DIRM de la région d'implantation de chaque laboratoire demandeur.

Je vous demande donc de transférer au bureau cité ci-dessus, dans les meilleurs délais après réception, les demandes de reconnaissance qui vous seraient adressées.

V - Diffusion de la liste des laboratoires reconnus

La mise en oeuvre de la reconnaissance exige d'aboutir à une liste centralisée des laboratoires concernés.

La DGAL, bureau des laboratoires et de la coordination des contrôles officiels, publiera donc la liste des

laboratoires reconnus pour la réalisation des analyses d'autocontrôles de dépistage des bactéries appartenant au genre *Vibrio* (*V. splendidus* et *V. aestuarianus)* et de l'herpès virus OsHV-1 (génotype de référence et génotype µvar) chez les mollusques marins.

Cette liste sera disponible sur le bulletin officiel du ministère en charge de l'agriculture et mise à jour en tant que de besoin.

Il en est de même pour la liste des laboratoires agréés qui de fait sont reconnus pour les analyses d'autocontrôles.

Seuls les laboratoires présents sur ces listes (liste des laboratoires agréés et liste des laboratoires reconnus) pourront donc, dès leur publication, réaliser les analyses d'autocontrôles.

Une mise en ligne de ces listes sur le site du ministère sera prévue. Enfin, elles devraient être à terme disponibles dans Sigal.

VI - Laboratoire national de référence

Institut Français de Recherche pour l' Exploitation de la mer
Laboratoire de Génétique et Pathologie
Ronce-les-Bains
17390 La Tremblade
Tel : 05 46 76 26 10
Fax : 05 46 76 26 11
Email : trenault@ifremer.fr

L'Adjoint au sous directeur du pilotage
et des politiques sanitaires transversales

Frédéric STAINER

Annexe I (Formulaire de demande de reconnaissance)

MINISTERE DE L'ALIMENTATION DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE

PREFECTURE DE :

DIRECTION DEPARTEMENTALE EN CHARGE DE LA PROTECTION DES POPULATIONS

DEMANDE DE RECONNAISSANCE

pour la recherche de bactéries appartenant au genre Vibrio (V. splendidus et V. aestuarianus) et de l'herpès virus OsHV-1 (génotype de référence et génotype µvar) chez les mollusques marins

I Identification du laboratoire

1) responsable établissement Nom Prénom : .... Qualité :	Responsable laboratoire (si différent de l'établissement) : Nom Prénom : .... Qualité : ....
2) Coordonnées de l'établissement Raison Sociale : .... Statut juridique : .... Téléphone : I_I_I I_I_I I_I_I I_I_I I_I_I Télécopie : I_I_I I_I_I I_I_I I_I_I I_I_I Adresse électronique : ..... Date d'ouverture de l'établissement : I_I_I/I_I_I/I_I_II_I_I Code APE/NAF : : I_I_I I_I I_I_I	Adresse de l'établissement : .... Code postal : ..... Commune : ..... Date d'entrée en activité : ..... Adresse de courrier (si différente de l'adresse de l'établissement) : .... Code postal : ..... Commune : ..... Adresse du siège social (si différente de l'adresse de l'établissement) : .... Code postal : ..... Commune : .....

II. – Demande de reconnaissance

Je soussigné(e) **.....** responsable de l'établissement, sollicite la reconnaissance du laboratoire désigné ci-dessus pour les essais relatifs à la recherche de bactéries appartenant au genre *Vibrio* (*V. splendidus* et *V. aestuarianus)* et de l'herpès virus OsHV-1 (génotype de référence et OsHV-1 µvar) chez les mollusques marins.

Je m'engage à suivre la formation dispensée par le LNR pour toutes les méthodes concernées et à participer aux essais interlaboratoires d'aptitude correspondants organisés par le LNR.

Dès la délivrance de la reconnaissance, je m'engage à ce que le laboratoire et les équipes dont j'ai la responsabilité :

- respectent les critères fixés par les articles R. 202-22 à Art. R. 202-32 du code rural et ceux relatifs aux laboratoires d'analyse d'autocontrôles décrits dans l'arrêté en application duquel j'effectue la présente demande de reconnaissance;
- réalisent les analyses de recherche pour lesquelles la reconnaissance est demandée selon les méthodes reconnues par le ministre chargé de l'agriculture (direction générale de l'alimentation);
- entretiennent en permanence leur compétence pour le type d'analyse faisant l'objet de la reconnaissance, notamment par la participation aux processus d'évaluations techniques liés à cette reconnaissance ;
- effectuent une demande d'accréditation pour tout domaine analytique pour lequel cette démarche aurait été rendue obligatoire ;
- informent, au moins 3 mois à l'avance, le ministre chargé de l'agriculture (Direction générale de l'alimentation) de toute décision d'arrêter ou de suspendre la réalisation des analyses d'auto contrôles faisant l'objet de la présente reconnaissance.

Je suis informé(e) que mon établissement pourra être retiré de la liste des laboratoires reconnus en cas de manquement à l'une ou plusieurs de ces conditions

SIGNATURE DU DEMANDEUR Le Nom – Prénom du signataire : ..... Cachet de l'établissement Signature	**RECEPISSE DE DEMANDE DE RECONNAISSANCE (cadre réservé à l'administration)** Déclaration reçue le **:** Cachet de la DD(CS)PP ou de la DGAL

Annexe II : Analyses

1. Transfert et documents d'accompagnement des prélèvements

I. Les prélèvements sont réalisés par le détenteur des animaux ou son délégataire. Le préleveur s'assure que les prélèvements parviennent au laboratoire dans les 48 heures ouvrées suivant leur collecte.

II. Un document précisant, au minimum l'identification précise du site et la nature du prélèvement, le stade de production, le mode d'élevage concerné, l'âge des animaux à la date du prélèvement, ainsi que l'identité de la personne ayant effectué le prélèvement doit accompagner chaque prélèvement transmis pour analyse au laboratoire.

2. Méthodes à mettre en œuvre

Pour la recherche de l'herpès virus OsHV-1 (génotypes de référence et µvar) et des bactéries *Vibrio splendidus* et *V. aestuarianus*.

1. Détection de l'herpès virus OsHV-1 par PCR en temps réel

La méthode analytique utilisée est basée sur une technique publiée (Pépin *et al.*, 2008, Rapid and sentivive detection of ostreid herpes virus 1 in oyster samples by real-time PCR, J. Virol. Meth., 149, 269-276). Elle consiste en une amplification en temps réel basée sur la chimie SYBR green et l'utilisation du couple d'amorces DP-F/DP-R ciblant le gène de l'ADN polymérase du virus OsHV-1. Cette technique ne permet cependant pas de différencier le génotype de référence du génotype µvar.

2. Détection ciblée du génotype OsHV-1 µvar par PCR classique

La présente procédure décrit une méthode de diagnostic standard à utiliser pour la détection et l'identification du virus OsHV-1 µvar par réaction en chaîne par polymérase (PCR) basée sur l'utilisation du couple d'amorces CF/CR et de l'analyse des produits de PCR en gel d'agarose (cf. Annexe Règlement européen 175/2010 du 2 mars 2010). Elle permet de distinguer le génotype OsHV-1 de référence du génotype µvar sur la base de leur taille en paires de base (bp) (173 bp pour le génotype de référence et 157 pour le génotype µvar).

3. Recherche de bactéries appartenant, soit au groupe polyphylétique de *Vibrio splendidus*, soit à l'espèce *V. aestuarianus*

La méthode analytique utilisée pour l'identification de bactéries appartenant au groupe *V. splendidus* ou à l'espèce *V. aestuarianus* est basée sur une technique de PCR Taqman multiplex qualitative développée par l'Ifremer (LGP, La Tremblade) et en cours de publication (Saulnier *et al.*, en préparation).

Cette méthode s'inspire en partie de la méthode de quantification par PCRq de *V. aestuarianus* (Saulnier *et al.*, 2009, Real-time PCR assay for rapid detection and quantification of *Vibrio aestuarianus* in oyster and seawater: a useful tool for epidemiologic studies, Journal of Microbiological Methods,,77(2), 191-197).

Elle consiste en une amplification par PCRq multiplex d'ADN d'isolats bactériens, à l'aide du couple d'amorces et sonde Taqman (SpF/SpR et Spprobe pour *V. splendidus*), fournis par l'Ifremer et DNAjaesF1/DNAjaesR1/DNAj probe pour *V. aestuarianus*.

Tous les isolats bactériens appartenant au groupe polyphylétique de *V. splendidus* sont détectés de façon spécifique (signal FAM). Ce groupe est actuellement représenté, en l'état actuel des connaissances, par huit espèces, génétiquement très proches: *V. lentus, V. cyclitrophicus, V. pomeroyi, V. tasmaniensis, V. splendidus, V. kanaloae, V. gigantis et V. crassostreae*.

De même, tous les isolats bactériens appartenant à l'espèce *V. aestuarianus* sont détectés de façon spécifique (signal Texas Red).