

## Note de synthèse sur les rapports d'activités 2019 des mandats de LNR portés par l'Anses

En application du Code rural et de la pêche maritime et du Code de la santé publique, l'Anses porte différents mandats de laboratoire national de référence (LNR) dans les domaines de la santé animale (SA), de la santé des végétaux (SV) et de la sécurité sanitaire des aliments (SSA) y compris des eaux destinées à la consommation. Ces activités de référence sont mises en œuvre dans le cadre des unités spécialisées des laboratoires de l'Agence.

En 2019, ces mandats de LNR étaient au nombre de 65 : 36 en SA, 17 en SSA et 12 en SV, soit un mandat de moins qu'en 2018 du fait de l'octroi du mandat « Diarrhée virale bovine (BVD) » et de l'arrêt des mandats « Lait » et « Fièvre de la Vallée du Rift ». On notera qu'en 2019, six laboratoires de l'Anses porteurs de mandats LNR détenaient également 12 mandats de laboratoire de référence de l'Union européenne (LRUE), soit quatre de plus qu'en 2018 : trois mandats en SV et un en SA.

Les missions des LNR visent à assurer la fiabilité des analyses officielles réalisées pour le compte des autorités sanitaires dans ces différents domaines, à travers notamment :

- le développement, l'optimisation et la validation des méthodes d'analyse destinées à être utilisées dans ce cadre ;
- l'animation technique du réseau des laboratoires (notamment les laboratoires départementaux) agréés par l'Etat, y compris la vérification de l'aptitude de ces laboratoires à travers notamment l'organisation d'essais inter-laboratoires d'aptitude (EILA) ;
- le cas échéant, la réalisation d'analyses officielles et notamment la confirmation de résultats d'analyses réalisées par des laboratoires agréés.

Quatre LNR ont assuré en 2019 une mission d'animation de réseaux de laboratoires reconnus par l'Etat pour les analyses d'autocontrôle des acteurs de la chaîne alimentaire.

Certains LNR réalisent par ailleurs des contrôles de réactifs de diagnostic commerciaux (cela a concerné 21 LNR en 2019), produisent et fournissent des réactifs (pour 13 LNR sur l'année), produisent et fournissent des matériaux de référence (pour 32 LNR) à usage de leurs réseaux de laboratoires agréés. Les contrôles de kits commerciaux sont réalisés par un nombre croissant de LNR : pour mémoire, en 2018, 16 LNR ont contrôlé des lots de réactifs (2017 : 16 ; 2016 : 17 ; 2015 : 15). Le nombre de LNR produisant et fournissant des réactifs se stabilise (2018 : 14 ; 2017 : 12 ; 2016 : 13 ; 2015 : 15) ainsi que le nombre de LNR produisant et fournissant des matériaux de référence (2018 : 32 ; 2017 : 33 ; 2016 : 35 ; 2015 : 36).

Les LNR contribuent par ailleurs à la surveillance épidémiologique et à la veille des dangers sanitaires dont ils ont la charge, le cas échéant dans le cadre des plateformes d'épidémiostveillance. En 2019, 63 fiches d'alerte ou de signal ont été émises par 22 de nos LNR via Salsa, le système d'alertes sanitaires de l'Anses mis en place mi-2017. Le nombre de fiches émises a augmenté (51 fiches émises par 21 LNR en 2018).

Les LNR apportent aussi, en tant que de besoin, un appui scientifique et technique (AST) aux tutelles, conformément à leurs missions définies réglementairement. En 2019, 17 rapports d'AST ont été rendus par 11 LNR en réponse aux demandes de l'année (29 demandes adressées à 13 LNR en 2019) ou de l'année précédente.

## **Développement, optimisation et validation des méthodes d'analyse proposées à l'autorité sanitaire**

Le renforcement des capacités de détection et de contrôle sur toute la chaîne alimentaire ainsi qu'en SA et SV est un enjeu majeur et l'une des missions premières des laboratoires de référence de l'Anses. Dans ce cadre, nos LNR sont amenés à développer, valider, soumettre à consultation à la communauté des laboratoires puis publier sur le site de l'Anses des méthodes d'analyse avant de les proposer à l'autorité sanitaire pour officialisation.

Ainsi, en 2019, 24 méthodes ont été développées ou révisées et proposées à l'autorité sanitaire par 10 de nos LNR, réparties selon les trois différents champs comme suit : 11 en SSA, neuf en SA et quatre en SV.

Ce nombre reste stable par rapport à 2018 où 21 méthodes avaient été développées ou révisées et proposées à l'autorité sanitaire par 13 de nos LNR (8 en SSA, 7 en SA et 6 en SV), sachant qu'on avait observé une diminution par rapport aux années précédentes : en 2017, 32 méthodes avaient été développées ou révisées et proposées à l'officialisation par 17 LNR (13 en SSA, 10 en SA et 9 en SV), après un pic en 2016 où 48 méthodes avaient été développées ou révisées et proposées à l'officialisation par 27 LNR (14 en SSA, 13 en SA et 21 en SV).

Au total, 14 méthodes ont été transférées par les LNR à leurs réseaux de laboratoires en 2019.

On peut noter à titre illustratif quelques méthodes développées et/ou proposées à l'officialisation en 2019 :

- Suite à la révision en 2017 de la norme internationale NF EN ISO 21872-1, le LNR « *Vibrio* dans les produits de la pêche » a constitué des dossiers de validation et proposé à l'autorité compétente des méthodes de biologie moléculaire pour identifier les principales espèces de *Vibrio* d'origine alimentaire :
  - L'identification des souches de *Vibrio cholerae* par PCR en point final
  - La recherche des gènes codant pour la toxine cholérique de *Vibrio cholerae* par PCR en point final
  - L'identification des souches de *Vibrio vulnificus* par PCR en temps réel et par PCR en point final (en l'absence de marqueur de virulence connu, les experts mondiaux considèrent que toutes les souches de *Vibrio vulnificus* sont pathogènes).

Les bactéries du genre *Vibrio* sont naturellement présentes dans l'environnement marin et estuarien, avec une abondance maximale pendant les mois les plus chauds de l'année et dans les eaux de mer chaudes. Le réchauffement climatique crée un environnement favorable au développement des vibrions. On distingue deux populations de vibrions potentiellement pathogènes pour l'homme : les vibrions cholériques (*Vibrio cholerae* O1 et O139, agent du choléra) et les vibrions non cholériques (*Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* non O1 et non O139 et *Vibrio vulnificus* étant les principales espèces pathogènes pour l'homme). En cas de détection de souches potentiellement pathogènes de *Vibrio* spp à la suite d'un contrôle officiel, les lots contaminés doivent être rappelés et détruits dans les meilleurs délais (comme précisé dans l'instruction technique DGAL/SDSSA/2019-486 du 2 juillet 2019).

- En 2019 le LNR « santé des abeilles » a proposé à l'autorité compétente les méthodes :
  - de recherche et quantification des virus d'abeilles par RT-qPCR : ABPV (Acute bee paralysis virus), BQCV (Black queen cell virus), DWV-A et DWV-B (Deformed wings virus), et SBV (Sacbrood virus), laquelle a fait l'objet d'une révision majeure en 2019. L'échantillonnage, qui ciblait 10 abeilles symptomatiques, a été étendu à 50 abeilles sans signe clinique. Une partie sur l'interprétation des charges virales au regard de seuils séparant les infections sub-cliniques des infections cliniques a été ajoutée.

- de recherche des néonicotinoïdes dans les abeilles, méthode accréditée depuis 2009 et qui a été modifiée pour inclure le sulfoxaflor. Cette méthode permet de diminuer le temps et le coût de préparation des échantillons en procédant à une extraction liquide/liquide et purification sur phase dispersive (SPE dispersive) avant le dosage par LC-MS/MS.
- de recherche de la loque américaine et de la loque européenne par PCR-TR, méthode accréditée en 2019 et qui fait l'objet d'essais complémentaires pour identifier des seuils diagnostiques de confirmation des cas cliniques de ces deux maladies. Cette méthode qualitative permet de détecter la présence des génomes de *Paenibacillus larvae* et de *Melissococcus plutonius* sur du couvain d'abeilles. Elle est plus sensible et plus spécifique que les méthodes par PCR conventionnelle utilisées jusqu'alors pour l'identification de ces agents bactériens.
- Plusieurs champignons pathogènes des agrumes sont des parasites de quarantaine importants pour l'Union européenne. En particulier, trois d'entre eux produisent des symptômes qui peuvent être confondus entre eux lors d'une inspection visuelle à l'importation. Dans le cadre d'un partenariat Hubert Curien avec l'Agricultural Research Centre du Caire, Egypte, un projet de recherche a visé à développer un nouveau test rapide et spécifique permettant de détecter simultanément ces trois champignons, agents de taches sur des fruits suspects. Une nouvelle méthode a ainsi été proposée à l'autorité compétente par le LNR « champignons sur toutes matrices » pour la détection de *Elsinoë fawcettii*, *Elsinoë australis* et *Pseudocercospora angolensis* par PCR en temps réel quadruplex. La méthode permet de produire des résultats en une journée, et de réduire au minimum le délai de blocage en douane à l'importation par les services d'inspection phytosanitaires.

De nouveaux tests de détection du champignon responsable du " wheat blast " (Lignée *Triticum* de *Pyricularia oryzae*) par PCR, PCR en temps réel et LAMP ont également été développés dans le cadre d'une thèse co-encadrée par l'Anses et le Cirad. Ce champignon représente une menace majeure pour la filière blé en Europe et pourrait être introduit via le commerce de semences contaminées, ou par un saut d'hôte de l'agent pathogène entre des graminées sauvages et le blé. L'utilisation de ces nouveaux tests permettra de disposer d'outils pour prévenir l'introduction de cette maladie dévastatrice en Europe.

Enfin, suite à une résurgence de symptômes de pourridié du pin dans de nombreux massifs forestiers français, la question de l'introduction d'*Heterobasidion irregulare*, champignon pathogène émergent en Italie s'est posée. Trois autres espèces responsables de ce type de symptôme très difficiles à identifier microbiologiquement sont déjà présentes en Europe. Le LNR a exploité de nouveaux gènes pour le développement d'un test de détection par PCR en temps réel multiplexe des quatre espèces potentiellement présentes.

## Animation de réseaux

### **Caractéristiques des réseaux de laboratoires agréés ou reconnus**

La taille des réseaux de laboratoires agréés ou reconnus animés par les LNR de l'Anses est très variable en fonction de l'agent pathogène ou du contaminant concerné.

En 2019, on a répertorié sept réseaux de moins de cinq laboratoires agréés, 15 réseaux de cinq à neuf laboratoires, sept réseaux de 10 à 19 laboratoires et 17 réseaux de plus de 20 laboratoires.

Le nombre de réseaux de moins de 10 laboratoires reste stable (23 en 2018) et le nombre de réseaux de plus de 20 laboratoires diminue légèrement (19 en 2018). Le plus grand réseau

animé par l'Anses réunit 130 laboratoires (en légère diminution : 136 depuis 2015). Dix-sept LNR n'animent pas de réseau de laboratoires.

En ce qui concerne les quatre réseaux de laboratoires reconnus : trois réseaux sont constitués de 10 à 19 laboratoires et un réseau comporte 22 laboratoires.

### **Essais inter-laboratoires d'aptitude**

Pour s'assurer de la bonne maîtrise des différentes méthodes d'analyse utilisées par les laboratoires agréés, les LNR organisent notamment des EILA. Il s'agit de faire parvenir à tous les laboratoires agréés un panel d'échantillons préparés par le LNR pour analyse, permettant de détecter d'éventuels écarts de résultats entre le LNR et les laboratoires du réseau.

En 2019, 55 EILA ont été organisés par 36 LNR de l'Agence. Vingt-trois LNR ont organisé un EILA, neuf en ont organisé deux, trois en ont organisé trois et un en a organisé cinq. Le nombre d'EILA reste stable par rapport aux années précédentes (52 EILA ont été organisés en 2018, 56 en 2017, 59 en 2016 et 55 en 2015). Le nombre de LNR organisateurs d'EILA varie d'une année sur l'autre (33 en 2018, 36 en 2017, 35 en 2016 et 49 en 2015) en fonction de la maturité des réseaux, des évolutions de méthodes, des crises sanitaires, ce qui explique les variations annuelles constatées à nombre de mandats stable (65 mandats portés en 2015, 2016 et 2017 et 66 en 2018).

Les 55 EILA organisés en 2019 étaient répartis comme suit : 21 en SSA, 25 en SA et neuf en SV. Le nombre d'EILA se stabilise en SSA, est en légère augmentation en SA et reste stable en SV où les LNR, en accord avec la tutelle, ont organisé d'autres types d'évaluation de l'aptitude (analyses en doublon par exemple) plus adaptés pour les petits réseaux que des EILA.

Les EILA organisés par nos LNR sont réalisés dans le respect des exigences de la norme NF EN ISO 17043. Le nombre d'EILA réalisés sous accréditation selon cette norme augmente régulièrement : 10 en 2015, 11 en 2016, 12 en 2017, 13 en 2018 et 19 en 2019.

Les 55 EILA réalisés en 2019, ouverts aussi à des laboratoires non agréés pour un grand nombre d'entre eux, ont concerné de trois à 84 participants (tous types de laboratoires confondus : agréés, non agréés, français, étrangers), soit un total de 1342 participations. En fonction des EILA, jusqu'à 77 laboratoires agréés ont participé, soit un total de 992 participations de laboratoires agréés (dont cinq dans le cadre d'une demande d'agrément), un même laboratoire agréé pouvant participer à plus d'une vingtaine d'EILA organisés par l'Anses.

Deux LNR de l'agence exploitent les résultats d'un EILA organisé par un tiers pour évaluer les performances des laboratoires du réseau. Ces deux LNR participent avec les laboratoires agréés du réseau à l'EILA réalisé sous accréditation.

Les faits marquants à noter pour l'année sont :

- la mise en œuvre des premiers essais inter-laboratoires de transfert (EILT) selon les recommandations du guide Anses sur le transfert des méthodes d'analyses, diffusé en 2018 après consultation des tutelles et des représentants des associations des laboratoires agréés,
- la contribution des LNR aux travaux du Groupe de travail interne à l'Anses pour l'élaboration de procédures et outils relatifs au contrôle de réactifs.

## **Journées d'échange et de restitution rassemblant les laboratoires agréés ou reconnus du réseau**

Les journées d'échange et de restitution sont des moments de partage privilégiés avec les laboratoires agréés ou reconnus des réseaux, afin, notamment, de faire le bilan des EILA organisés dans l'année et de présenter les travaux de développement de méthodes en cours. En 2019, 22,5 journées ont été organisées par l'Anses. Ce nombre est en diminution par rapport aux années précédentes (26 en 2015, 42 en 2016, 31 en 2017, 32 en 2018).

## **Formation des personnels des laboratoires agréés aux méthodes utilisées pour les contrôles officiels**

Seize sessions de formation des personnels des laboratoires agréés aux méthodes utilisées pour les contrôles officiels ont été organisées en 2019 par les LNR de l'Anses. Ce nombre de sessions de formation est en baisse régulière (12 en 2018, 25 en 2017, 26 en 2016, 36 en 2015, 29 en 2014, 46 en 2013, 48 en 2012) qui s'explique par le gain en maturité d'un grand nombre des réseaux que l'Anses anime.

## **Réalisation d'analyses officielles**

Les LNR de l'Anses sont amenés à réaliser des analyses de seconde intention, afin, notamment, de confirmer, en tant que de besoin, les résultats d'analyse des laboratoires agréés. Ils réalisent également des analyses de première intention dans un certain nombre de cas, notamment lorsqu'il n'existe pas de réseau de laboratoires agréés pour l'agent pathogène ou le contaminant considéré.

## **Relations avec les CNR**

Les journées d'échanges co-organisées en 2016 et 2017 par l'Agence et Santé Publique France, afin de mieux connaître les attentes respectives des LNR et CNR dont les mandats se recoupent et de favoriser la coordination et les collaborations, ont renforcé une dynamique partagée.

En 2019, neuf LNR de l'Agence sur 21 ont rencontré le CNR dont le mandat correspond pour tout ou partie au leur. Huit des 21 LNR collaborent avec le CNR dans le cadre de la surveillance et 10 collaborent dans le cadre de projets de recherche (13 et 11 respectivement en 2018).

A noter également que l'Anses et Santé Publique France avaient travaillé en 2017 à la préparation d'une trame commune et simplifiée d'Accord de Transfert de Matériel afin de faciliter au mieux les échanges de matériels biologiques entre LNR et CNR dans le cadre de leurs activités de référence, document qui est en cours de finalisation. En 2019, 10 LNR ont enregistré des échanges dans ce cadre (11 en 2018).

## **Conclusion**

Pendant l'année 2019, les LNR de l'Anses ont continué d'assurer leurs missions de référence en développant et validant les méthodes *ad hoc* et en garantissant la qualité des analyses des laboratoires agréés et reconnus, tout en fournissant un appui, parfois dans l'urgence, dans la gestion d'incidents et crises sanitaires qui ont pu survenir dans l'année.

A noter comme fait marquant cette année l'obtention de quatre nouveaux mandats européens, laquelle constitue une reconnaissance de la compétence des laboratoires porteurs des mandats de LNR correspondants.

Les travaux visant l'amélioration de l'efficience des activités de l'Anses en matière de référence, travaux déjà largement engagés depuis plusieurs années en matière notamment d'organisation d'EILA et de validation et transfert de méthodes, ont continué pendant l'année 2019 et se poursuivront en 2020. L'accent sera mis tout spécialement sur les activités de contrôles de réactifs et sur les aspects fréquence / mutualisation des EILA, en concertation avec l'autorité sanitaire.