



Maisons-Alfort, le 4 décembre 2009

## AVIS

### de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif au dispositif de surveillance des phycotoxines lipophiles dans les zones conchylicoles concernant la détermination des périodes à risque et des points de référence

#### 1. RAPPEL DE LA SAISINE

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) a été saisie le 23 juillet 2009 par la Direction générale de l'alimentation (DGAI) d'une demande d'avis relatif au dispositif de surveillance des phycotoxines lipophiles dans les zones conchylicoles concernant la détermination des périodes à risque et des points de référence.

#### 2. CONTEXTE ET QUESTIONS POSÉES

Les exigences pour la surveillance des phycotoxines sont définies au niveau communautaire par les règlements (CE) n°853/2004, n°854/2004 et n°2074/2005. En France, la surveillance des zones de production est assurée par l'Ifremer<sup>1</sup> à travers le réseau REPHY<sup>2</sup>, dont le cahier technique décrivant les modalités opérationnelles de la surveillance est revu annuellement.

Pour les gisements au large (pectinidés et autres coquillages, tels que palourdes roses, amandes, etc), pour lesquels la distance de la côte et la profondeur des gisements exploités (benthiques ou enfouis) ne permettent pas un échantillonnage représentatif du phytoplancton dans la colonne d'eau, la recherche des trois familles de toxines est effectuée de manière systématique<sup>3</sup> dans les coquillages un mois et deux semaines avant la période de pêche. Pendant la période de pêche, tant qu'aucune toxine n'est détectée, la fréquence d'échantillonnage des coquillages est d'une fois par quinzaine ; pendant un épisode toxique, elle est d'une fois par semaine.

Pour les gisements et les élevages côtiers, la surveillance des phycotoxines lipophiles dans les coquillages est systématique dans les **zones à risque** et en **période à risque** (voir définitions au point 4). En dehors des périodes à risque, la stratégie est identique à celle appliquée pour les phycotoxines paralysantes et amnésiantes. Cela signifie qu'elle est basée sur la détection dans l'eau des espèces phytoplanctoniques connues pour produire des phycotoxines, ce qui déclenche en cas de dépassement du seuil d'alerte phytoplanctonique, la recherche des phycotoxines correspondantes dans les coquillages.

En pratique, cette surveillance repose sur :

- des prélèvements d'eau de mer, dont la fréquence varie d'une fois par semaine à une fois par mois, visant à rechercher la présence d'espèces phytoplanctoniques toxigènes ;
- la recherche des phycotoxines lipophiles dans les coquillages dans différentes situations :
  - o lorsque des espèces phytoplanctoniques toxigènes ont été identifiées dans les prélèvements d'eau de mer et sont donc susceptibles d'avoir entraîné la contamination des coquillages (fréquence d'une fois par semaine) ;
  - o de façon systématique sur 10 points de référence répartis sur le littoral français (fréquence d'une fois par mois) ;
  - o de façon systématique dans les zones à risque pendant les périodes à risque (fréquence d'une fois par semaine).

<sup>1</sup> Ifremer : Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer

<sup>2</sup> REPHY : Réseau de surveillance du phytoplancton et des phycotoxines

<sup>3</sup> à savoir une analyse des toxines directement dans les coquillages, sans s'appuyer sur les dépassements des seuils en phytoplancton toxigène indicateur.

Les points de référence ont été créés en 2006. Initialement au nombre de 7, ils sont passés à 10 en 2008. La création des points de référence et des périodes à risque ont notamment permis de répondre à la demande de l'Office Alimentaire et Vétérinaire (OAV) de la Commission européenne (suite à une inspection en 2004) de renforcer les tests réalisés sur les coquillages y compris lors de la non détection de phytoplancton toxigène.

Dans ce contexte, il est demandé à l'Afssa de proposer des améliorations concernant :

- la détermination des périodes à risque (modalités de définition des périodes à risque, fréquence de surveillance...);
- la surveillance réalisée aux points de référence (nombre, localisation, fréquence de surveillance...).

L'Afssa est également invitée à formuler des recommandations d'adaptation du dispositif de surveillance des phycotoxines lipophiles dans les zones conchylicoles.

Les éléments de réponse apportés pourront être pris en compte dans le cadre de la révision annuelle du cahier de procédures et de programmation REPHY pour l'année 2010.

### 3. MÉTHODE D'EXPERTISE

Le groupe d'expertise collective d'urgence (GECU) « Phycotoxines/Période à risque » créé par décision de la Directrice générale adjointe de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments, en concertation avec le président du Comité d'experts spécialisé « Résidus et Contaminants Chimiques et Physiques » a été chargé de mener cette expertise.

Ce GECU « Phycotoxines/Période à risque » est composé :

- d'experts du Comité d'Experts Spécialisé « Résidus et contaminants chimiques et physiques » ;
- d'experts de l'Ifremer, Département EMP (Environnement, Microbiologie, Phycotoxines) et Département DYNECO/VIGIES (DYNamiques de l'Environnement Côtier/Valorisation de l'Information pour la Gestion Intégrée Et la Surveillance) ;
- d'experts de l'Unité CAractérisation des Toxines (CAT), du Laboratoire d'Etudes et de Recherche sur la Qualité des Aliments et les Procédés agroalimentaires (Afssa/LERQAP) qui est le Laboratoire national de référence pour les biotoxines marines ;
- d'experts de la Direction de l'Evaluation des Risques Nutritionnels et Sanitaires (DERNS).

Après consultation du GECU « Phycotoxines/Période à risque » et du Comité d'Experts Spécialisé « Résidus et Contaminants Chimiques et Physiques », réunis les 13 et 20 novembre 2009, l'Afssa rend l'avis suivant.

### 4. QUESTION 1 : PÉRIODES À RISQUE

La détermination des **périodes à risque** a été initiée en 2005 selon un critère empirique utilisé jusqu'en 2008 inclus : une période à risque recouvre « l'ensemble des mois concernés par la présence de toxines lipophiles, pour chacune des zones à risque, selon la règle suivante : l'union des mois sur les six dernières années, pour ceux qui ont été concernés au moins deux fois par des toxicités<sup>4</sup> ; une seule observation pendant l'une des deux dernières années (2006 - 2007) suffit cependant à décrire le mois concerné en période à risque » (extrait du Cahier REPHY 2008).

Pour 2009, la période à risque recouvre, pour chacune des zones à risque, l'ensemble des mois pour lesquels un bio-essai positif a été observé sur au moins deux des six dernières années.

Les **zones à risque** sont les zones pour lesquelles un bio-essai positif a été observé au moins deux années différentes au cours des six dernières années (avant 2009, une seule observation suffisait à caractériser la zone comme étant à risque).

<sup>4</sup> Correspondant à un bio-essai souris positif : 2/3 ou 3/3 souris mortes en 24 h

Afin d'identifier les critères non empiriques à prendre en compte pour la détermination des périodes à risque, le GECU « Phycotoxines/Période à risque » a réalisé une analyse statistique des données transmises par Ifremer en vue de déterminer le nombre d'années et le nombre d'évènements à prendre en compte. Cette analyse, dont les détails sont présentés en annexes 1 et 2, a été réalisée sur la base des résultats :

- du bio-essai souris,
- des analyses chimiques supérieures aux seuils réglementaires<sup>5</sup>.

Les analyses préliminaires réalisées dans le cadre de ce GECU tendent à montrer que la période de temps apportant le plus d'informations s'étend sur les 3 dernières années (les 2 dernières années complètes et les résultats disponibles de l'année en cours). En effet, l'apport d'informations n'est plus significatif au-delà des 3 ans pour le bio-essai souris et au-delà des 2 ans pour l'analyse chimique.

Il convient toutefois de rappeler que cette conclusion repose sur les données issues de la surveillance, présentant un déséquilibre en termes de nombre d'analyses suivant les sites et suivant les mois de l'année. En outre, l'analyse chimique n'est en place que depuis quelques années et le nombre d'analyses portant sur un même site, un même mois et sur plusieurs années est restreint (voir annexes).

Concernant le nombre d'évènements à prendre en compte pour déterminer la période à risque, il convient de se reporter au graphique ci-dessous. Compte tenu du nombre d'analyses disponibles (série complète pour un site et un mois donné), seuls les résultats du bio-essai souris ont été pris en compte, pour les données postérieures à 2003<sup>6</sup> (annexe 1bis).

La courbe ROC (Receiver Operating Characteristics Curves) est une représentation graphique permettant d'optimiser le choix entre sensibilité et spécificité. La sensibilité et la spécificité sont en effet des paramètres indépendants de la prévalence des sites contaminés et illustrent les performances de la surveillance proposée. La sensibilité et la spécificité de la surveillance sont définies comme suit :

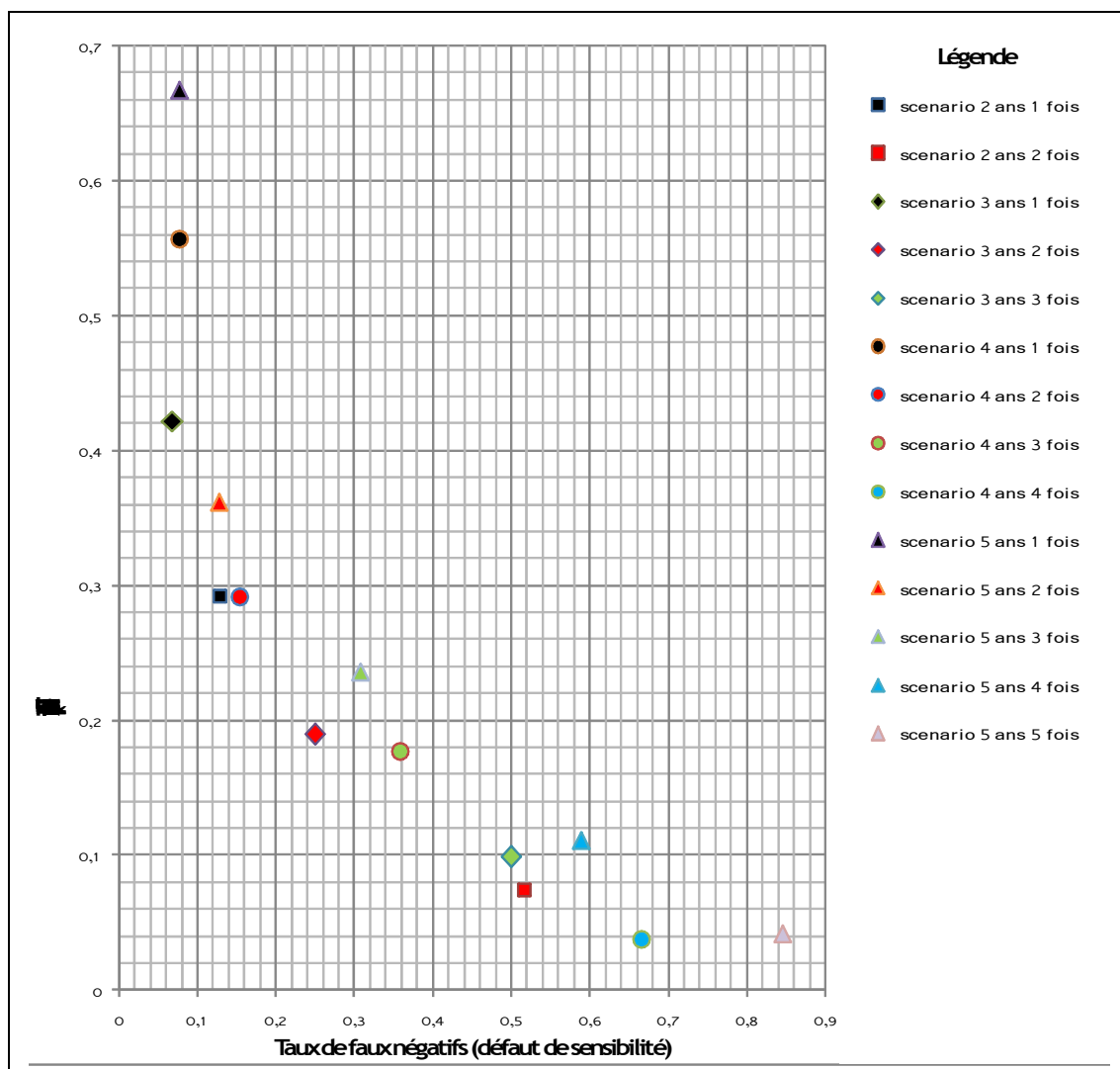
- La sensibilité (Se) se présente comme la détection d'un échantillon positif (M+) qui a été prédite de façon correcte par l'information correspondant à un scénario donné (T+), correspondant à une règle d'interprétation des résultats de l'historique d'un site. Un des scénarios étudiés, par exemple, considère que si le site, au cours d'un mois donné, a été trouvé 2 fois positif au cours des 5 dernières années, il est prédit comme positif. Formulé mathématiquement, ceci peut s'écrire de la façon suivante, P étant une probabilité conditionnelle :  $Se = P(T+/M+)$ .
- La spécificité (Sp) pour le même scénario se présente comme la détection d'un échantillon négatif (M-) qui aurait été prédit négatif selon le même scénario (T-). En suivant l'exemple précédent, le site considéré, le mois considéré aurait été trouvé moins de 2 fois positif au cours des 5 dernières années :  $Sp = P(T-/M-)$ .
- La sensibilité et la spécificité ne sont pas corrélées positivement. La sensibilité et la spécificité sont reliées directement au taux de faux positifs (TxfxPos) et de faux négatifs (TxfxNeg) que la règle de d'interprétation va générer. Formulé mathématiquement, ceci peut s'écrire de la façon suivante :  $Txfxpos = 1 - Sp$  et  $TxfxNeg = 1 - Se$

Sur la base des résultats du bio-essai souris, le graphique ci-dessous présente le taux de faux négatifs (en abscisse) et les taux de faux positifs (en ordonnée), sur une échelle de 0 à 1, s'inspirant donc du principe de la courbe ROC. Ainsi, selon cette analyse :

- le scénario « **2 résultats positifs au cours des 3 dernières années** » est le meilleur compromis entre le défaut de sensibilité (pas assez de détection de sites positifs, trop de faux négatifs) et le défaut de spécificité (trop d'échantillons non utiles, trop de faux positifs) ;
- le scénario « **1 résultat positif au cours des 3 dernières années** » est le scénario permettant d'offrir le niveau de sécurité le plus élevé pour le consommateur (valeur de défaut de sensibilité la plus faible).

<sup>5</sup> Voir le point 6 pour le détail des phycotoxines réglementées et des seuils en vigueur.

<sup>6</sup> Le protocole du bio-essai souris a été modifié en 2002.



**Graphique 1** : Défaut de sensibilité et de spécificité de la surveillance en fonction des critères de détermination des périodes à risque sur la base des résultats du bio-essai souris.

*Néanmoins, avant d'envisager une application de ce critère dans le cadre du REPHY, il conviendra de vérifier son efficacité en termes de prédiction de survenue d'épisodes de toxicité au travers de simulations sur quelques années antérieures.*

#### **Echelle temporelle des périodes à risque et fréquence de la surveillance**

Compte tenu de la variabilité des cinétiques de contamination et de décontamination des coquillages par les phycotoxines lipophiles, l'Afssa estime que :

- les périodes à risque doivent continuer à être déterminées sur une base mensuelle (et non sur une base hebdomadaire) ;
- la fréquence des prélèvements lors des périodes à risque doit rester hebdomadaire (et non bi-hebdomadaire comme cela a pu être observé dans certaines situations).

## **5. QUESTION 2 : POINTS DE RÉFÉRENCE**

Les points de référence sont des points de prélèvement faisant l'objet d'une double analyse systématique par bio-essai souris et par analyse chimique une fois par mois toute l'année (cet échantillonnage étant augmenté à une fois par semaine en période à risque ou pendant un épisode toxique, comme pour les autres points).

Le choix de la localisation de ces points tient compte de la nécessité de répondre aux exigences de la Commission Européenne : surveillance de l'ensemble du littoral pour compenser l'impossibilité pour la France, du fait du nombre important des zones de production, de répondre exactement à l'exigence réglementaire de faire des analyses systématiques eau / coquillages sur l'ensemble des points. Les critères de choix de ces points sont :

- une répartition géographique la plus homogène possible sur l'ensemble du littoral français ;
- la localisation dans des zones de production (moules ou huîtres) actives toute l'année (les zones de pêche étant exclues depuis 2009) ;
- la présence de résultats suspects ou non expliqués, à plusieurs reprises, pour environ la moitié de ces points ;
- la localisation dans des zones non à risque, pour une détection éventuelle de phycotoxines émergentes, pour le reste des points.

Un tableau en annexe 3 présente pour chacun des points de référence des renseignements relatifs à leur localisation, l'année de début du suivi, l'espèce ou les espèces de coquillages prélevés et les critères de sélection. Ce tableau est complété par une carte illustrant la répartition des 10 points de référence pour l'année 2009 (annexe 4).

L'analyse des résultats issus des 10 points de référence a montré (détaillée en annexe 5) :

- l'absence de bio-essai souris positif dans les zones non à risque ;
- quelques épisodes de toxicité en dehors des périodes à risque.

Le bilan est donc favorable puisque ces points ont non seulement permis de conforter la notion de zone non à risque mais ils ont également permis de compléter le dispositif de surveillance, les bio-essais positifs ayant conduit à des mesures de gestion (fermeture de zone).

Néanmoins, il convient de rester prudent quant à l'interprétation de ces résultats. En effet, sur les 10 points suivis en 2009, seuls 4 ont un historique depuis 2006 et 4 depuis 2008 (les 2 derniers étant de nouveaux points).

Par ailleurs, il convient de signaler qu'aucun des points de référence suivi en 2009 ou précédemment n'est représentatif de la mer ouverte sur la côte méditerranéenne. Les points « Parc Leucate » et « Diana Centre » sont représentatifs uniquement de leurs étangs respectifs (Salses-Leucate et Diana). Ceci s'explique par le manque de disponibilité de coquillages pour faire ce suivi. En accord avec l'avis de l'Afssa du 11 juillet 2008<sup>7</sup>, ce dispositif mériterait d'être complété pour intégrer les risques liés aux phycotoxines produites par différentes espèces du genre *Ostreopsis* présentes sur le littoral méditerranéen.

## **6. PREMIERS ÉLÉMENTS DE RECOMMANDATION POUR UN SYSTÈME DE VIGILANCE VIS-À-VIS DU RISQUE LIÉ AUX PHYCOTOXINES LIPOPHILES DANS LE CADRE D'UN SYSTÈME DE SURVEILLANCE BASÉ SUR L'ANALYSE CHIMIQUE DES PHYCOTOXINES RÉGLEMENTÉES**

Un système de surveillance des phycotoxines lipophiles dans les coquillages basé sur l'analyse chimique a pour objectif de surveiller celles qui sont réglementées :

- acide okadaïque et dinophysistoxines (DTX1, DTX2, DTX3) ;
- pecténotoxines: PTX1 et PTX2 ;
- yessotoxines: YTX, 45 OH YTX, Homo YTX, et 45 OH Homo YTX ;
- azaspiracides: AZA1, AZA2 et AZA3.

Les limites maximales dans les coquillages (corps entier ou toute partie consommable séparément) sont de :

- 160 microgrammes en équivalent-acide okadaïque par kilogramme pour l'acide okadaïque, les dinophysistoxines et les pecténotoxines ;
- 1 milligramme en équivalent-yessotoxine par kilogramme ;
- 160 microgrammes en équivalent-azaspiracide1 par kilogramme pour les azaspiracides.

<sup>7</sup> Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments du 11 juillet 2008 relatif à la pertinence de compléter le dispositif général de surveillance du milieu marin et des aliments mis sur le marché par la prise en compte de la microalgue épibenthique *Ostreopsis*.

Dans le cadre de l'évolution du dispositif national de surveillance des phycotoxines lipophiles dans les coquillages fondée sur l'analyse chimique des phycotoxines réglementées (LC/MS-MS) à la place du bio-essai souris, la mise en place d'un **système de vigilance** a pour objectif de :

- de détecter l'apparition de phycotoxines lipophiles connues non réglementées, de nouveaux analogues de phycotoxines connues ainsi que de phycotoxines émergentes ;
- d'opérer un suivi régulier hors périodes à risque et/ou en l'absence de phytoplancton toxique.

Le système de vigilance conduira ainsi à renforcer la sécurité des consommateurs en particulier dans les premières phases de migration du bio-essai souris vers l'analyse chimique.

**Concernant la surveillance des phycotoxines lipophiles connues non réglementées ou émergentes**, il apparaît que le bio-essai souris est en mesure d'assurer cette fonction pour une mise en œuvre dès 2010. Dans l'attente de développement de tests de dépistage rapide permettant de couvrir un éventail le plus large possible des types de toxicité correspondant aux toxines connues (effets gastro-intestinaux, hépatotoxicité, neurotoxicité...), l'Afssa recommande le maintien du bio-essai souris en tant qu'outil global de dépistage.

Il convient néanmoins de rappeler les principales limites de cet outil, lesquelles sont liées à des problèmes :

- de spécificité et de sensibilité en partie liées à la variabilité du matériel biologique (la souris) ;
- d'extrapolation à l'homme.

La pertinence du maintien du bio-essai souris dans un système de vigilance méritera d'être étudiée lorsque des tests de dépistage rapide seront disponibles, compte tenu notamment de l'avancée des travaux sur lignées cellulaires *in vitro*.

**Concernant une vigilance hors périodes à risque et/ou en l'absence de phytoplancton toxique**, il apparaît que les 10 points de référence définis pour l'année 2009 (cf point 5) constituent un dispositif à conserver pour 2010, permettant ainsi de poursuivre l'acquisition de données et d'établir un bilan historique sur ces points.

Comme précisé précédemment, ce dispositif mériterait toutefois d'être complété au plus tôt pour intégrer les risques liés aux phycotoxines produites par différentes espèces du genre *Ostreopsis* présentes sur le littoral méditerranéen. Il conviendrait, par exemple, d'étudier la possibilité d'avoir recours à des poches de moules immergées faisant office de bio-indicateur.

Dans le cadre d'une consolidation du dispositif, le nombre et la répartition géographique de ces points de vigilance pourraient faire l'objet d'une analyse complémentaire sur la base des données déjà acquises par Ifremer.

La fréquence pourrait être initialement mensuelle et pourrait être ajustée à l'aune d'une étude sur quelques points pour évaluer le pas de temps optimal (par exemple une ou deux fois par mois).

Les modalités de ce suivi pourraient comprendre :

- une analyse chimique des phycotoxines lipophiles connues non réglementées et des nouveaux analogues de phycotoxines connues ;
- un bio-essai (bio-essai souris dans l'attente de nouveaux outils alternatifs) ;
- un suivi du phytoplancton (lorsque cela est possible).

En cas d'un résultat positif du bio-essai souris non expliqué par les résultats de l'analyse chimique accompagné d'une situation inhabituelle (par exemple en termes de lieu, de période ou de symptomatologie des souris), il conviendrait que cet épisode soit examiné par une **Cellule de Vigilance** qui pourrait être composée par les membres du Comité de Pilotage (DGAI, DPMA, DGCCRF, DGS, Ifremer, Afssa/LNR Biotoxines marines) complétée par une représentation de l'InVs et de l'Afssa/DERNS pour apporter une valence liée à l'évaluation des risques sanitaires, en vue de proposer, selon la situation, des mesures de gestion et/ou des investigations complémentaires y compris sur l'aspect épidémiologique et/ou des mesures d'alerte.



**Concernant les phycotoxines paralysantes (PSP) et amnésiantes (ASP)**, il n'apparaît pas nécessaire de mettre en place un dispositif de vigilance. En effet, le dispositif actuel, fondé sur la réalisation d'analyses de coquillages lorsqu'il y a dépassement du seuil d'alerte fixé pour le phytoplancton producteur de ces toxines, permet d'assurer un niveau suffisant de protection du consommateur.

Le fait que, ces dernières années, les plans de surveillance mis en œuvre par la DGAI n'aient révélé aucun dépassement des seuils réglementaires en PSP et ASP dans les lots de coquillages mis sur le marché prouve indirectement que le dispositif de surveillance dans le milieu marin est efficace. A titre de comparaison concernant les phycotoxines lipophiles, entre 2006 et 2009, 4 échantillons de coquillages d'origine française prélevés dans le cadre des plans de surveillance ont montré des teneurs supérieures au seuil réglementaire.

## 6. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS

**Concernant la détermination des périodes à risque**, les analyses préliminaires tendent à montrer que la période de temps apportant le plus d'informations s'étend sur les 3 dernières années (les 2 dernières années complètes et les résultats disponibles de l'année en cours).

**Concernant le nombre d'évènements à prendre en compte**, il pourrait être de 1 ou 2 résultats positifs au cours des 3 dernières années, selon l'objectif retenu (compromis entre sensibilité et spécificité ou degré le plus élevé de protection du consommateur).

**Néanmoins, avant d'envisager une application de ce critère dans le cadre du REPHY, il conviendra de vérifier son efficacité en termes de prédiction de survenue d'épisodes de toxicité au travers de simulations sur quelques années antérieures.**

**Concernant les premiers éléments de recommandations pour un dispositif de vigilance vis-à-vis des phycotoxines lipophiles**, il apparaît que les 10 points de référence définis pour l'année 2009 constituent un dispositif à conserver pour 2010, permettant ainsi de poursuivre l'acquisition de données et d'établir un bilan historique sur ces points.

Ce dispositif mériterait toutefois d'être complété au plus tôt pour intégrer les risques liés aux phycotoxines produites par différentes espèces du genre *Ostreopsis* présentes sur le littoral méditerranéen.

Dans un contexte de mise en œuvre dès 2010, l'Afssa recommande le maintien du bio-essai en tant qu'outil global de dépistage dans ce dispositif de vigilance.

En cas d'un résultat positif du bio-essai souris non expliqué par les résultats de l'analyse chimique accompagné d'une situation inhabituelle (par exemple en termes de lieu, de période ou de symptomatologie des souris), il conviendrait que cet épisode soit examiné par une Cellule de Vigilance en vue de proposer, selon la situation, des mesures de gestion et/ou des investigations complémentaires y compris sur l'aspect épidémiologique et/ou des mesures d'alerte.

## 7. MOTS CLÉS.

Phycotoxines lipophiles, biotoxines marines, périodes à risque, points de référence, vigilance.

Le Directeur général de l'Agence française de sécurité  
sanitaire des aliments

Marc MORTUREUX

**Annexe 1a :**  
**Analyse n°1 du caractère prédictif de l'historique d'un site sur la base des résultats du bio-essai souris**

Le travail a été effectué à partir d'un fichier transmis par Ifremer rassemblant les données relatives à 9 677 analyses (bio-essai souris) réalisées entre janvier 1995 et décembre 2008 dans 245 sites.

Il s'agissait essentiellement de juger de la pertinence de la définition actuelle d'un "mois à risque" pour un site donné. Actuellement, un mois est considéré comme période à risque si ce mois est apparu deux fois positifs au cours des 6 années précédentes.

Pour un site donné, un mois est déclaré *positif* si au moins un bio-essai souris a conclu "TS+" (test souris positif). Il est considéré comme *négatif* si tous les bio-essais souris effectués au cours du mois ont conclu "TS-" (test souris négatif) ou "NA" (non analysé), avec au moins un test concluant "TS-". Enfin, un mois est déclaré *indéterminé* si aucun test n'a eu lieu au cours de ce mois ou si les tests effectués ont tous conclu "NA".

La classification d'un mois comme période à risque ne fait pas partie des données figurant dans le fichier. Elle a donc dû être recalculée à partir de la règle précédente. Compte tenu de la période couverte par les données, l'évaluation d'un mois comme période à risque ou période non à risque n'a été faite que pour la période de janvier 2001 à décembre 2008, soit 96 mois.

Afin de limiter la proportion de mois indéterminés (mois pour lesquels aucune analyse n'a été effectuée sur le lieu considéré), il n'a été tenu compte que des 25 sites pour lesquels plus de 100 analyses avaient été effectuées au cours de la période de janvier 1995 à décembre 2008 (moins deux sites utilisés comme points de référence<sup>8</sup>). Ces sites correspondent à 5 409 analyses sur les 9 677 analyses répertoriées et recouvrent une diversité de situations importante. Ainsi, pour le site 36083010 (Salses-Leucate), 307 analyses ont été effectuées, seuls 15 des 96 mois sont indéterminés et 53 mois (plus de la moitié) sont positifs. La présence de phycotoxines y est donc très fréquente. A l'inverse, le site 32071013 (Pertuis de Maumusson/Ronce) est régulièrement étudié (39 mois indéterminés et 57 mois donnant lieu à analyse) alors que la présence de phycotoxines n'a été constatée que pour un seul des 96 mois. D'autres sites semblent être moins régulièrement étudiés. Par exemple, pour le site 07015025 (Barfleur gisement), 76 mois sont indéterminés, 101 analyses ont été faites de 1995 à 2008, mais seuls 20 des 96 mois pris en compte ici sont concernés et toutes les analyses faites ont conclu négativement.

## RESULTATS

Au final, 2 400 observations (25 sites x 96 mois) ont été examinées selon les modalités suivantes:

- classification comme *mois à risque* ou *mois sans risque* ;
- résultat des analyses faites au cours du mois : *positif*, *négatif* ou *indéterminé*.

### Situation actuelle : 2 résultats positifs au cours des 6 dernières années

Les résultats obtenus sont les suivants :

		Classification du mois	
		Mois à risque	Mois sans risque
Résultat des analyses	Indéterminé	0	1231
	Positif (TS+)	267	178
	Négatif (TS-)	171	553

Ce tableau indique que la classification actuelle des périodes à risque a permis de prévoir les résultats positifs obtenus dans  $267/(267+178) = 60\%$  des cas. Pour les 40% restants, ce sont d'autres facteurs (bloom planctonique, etc.) qui ont conduit à décider de procéder à une analyse.

<sup>8</sup> Les deux sites 19036004 ("Basse Jaune") et 21041001 ("Les Glénan") n'ont pas été retenus car ils correspondent à des zones de coquillages de pêche. Les sites 43114102 ("Etang d'Urbino - Centre") et 37089003 ("Ingril Sud"), pour lesquels 98 et 96 analyses ont été effectuées, ont été retenus car très proches du critère d'inclusion des 100 analyses.



**Scénario N°1 : 1 résultat positif au cours des 6 dernières années**

On définit un mois comme période à risque si ce mois est apparu positif au moins une fois au cours des 6 années précédentes. Dans ce cas, les données étudiées conduisent au résultat suivant :

		Classification du mois	
		Mois à risque	Mois sans risque
Résultat des analyses	Indéterminé	220	1011
	Positif (TS+)	358	87
	Négatif (TS-)	326	398

Certains mois, classés à risque par cette nouvelle définition, n'ont pas fait l'objet d'une analyse permettant de confirmer le résultat positif. Les informations ainsi obtenues doivent donc être considérés avec précaution. Néanmoins, cette définition des périodes à risque permet de prévoir les résultats positifs obtenus dans  $358/(358+87) = 80,4\%$  des cas. Seuls 19,6% des résultats positifs ont été obtenus sur des périodes non à risque (faux négatifs). La qualité de la prévision serait ainsi doublée par rapport à la situation actuelle.

Les données disponibles ne permettent pas d'évaluer avec précision le nombre d'analyses supplémentaires rendues nécessaires par l'application de cette nouvelle règle. Cependant, ce nombre serait au moins égal au nombre de mois classés à risque par cette règle et pour lesquels aucune analyse n'a été faite, c'est-à-dire 220.

**Scénario N°2 : 1 résultat positif au cours des 4 dernières années**

On définit un mois comme période à risque si ce mois est apparu positif au moins une fois au cours des 4 années précédentes. Dans ce cas, les données étudiées conduisent au résultat suivant :

		Classification du mois	
		Mois à risque	Mois sans risque
Résultat des analyses	Indéterminé	188	1043
	Positif (TS+)	339	106
	Négatif (TS-)	294	430

Cette définition des périodes à risque permet de prévoir les résultats positifs obtenus dans  $339/(339+106) = 76,2\%$  des cas alors que 23,8% des résultats positifs ont été obtenus sur des périodes non à risque (faux négatifs). La qualité de la prévision est intermédiaire entre celle observée dans la situation actuelle et celle du scénario N°1, mais reste proche de celle du scénario N°1. Par ailleurs, le nombre d'analyses supplémentaires, évalué comme précédemment, serait au moins égal à 188.

**Ce scénario conduit à des résultats proches de ceux obtenus dans le scénario N°1.**

**Scénario N°3 : 1 résultat positif au cours des 2 dernières années**

On définit un mois comme période à risque si ce mois est apparu positif au moins une fois au cours des 2 années précédentes. Dans ce cas, les données étudiées conduisent au résultat suivant :

		Classification du mois	
		Mois à risque	Mois sans risque
Résultat des analyses	Indéterminé	122	1109
	Positif (TS+)	286	159
	Négatif (TS-)	218	506

Cette définition des périodes à risque permet de prévoir les résultats positifs obtenus dans  $286/(286+159) = 64,3\%$  des cas alors que 35,7% des résultats positifs ont été obtenus sur des périodes non à risqué (faux négatifs). Le nombre d'analyses supplémentaires, évalué comme précédemment, serait au moins égal à 122.

**Scénario N°4 : 1 résultat positif au cours des 3 dernières années**

On définit un mois comme période à risque si ce mois est apparu positif au moins une fois au cours des 3 années précédentes. Dans ce cas, les données étudiées conduisent au résultat suivant :

		Classification du mois	
		Mois à risque	Mois sans risque
Résultat des analyses	Indéterminé	162	1069
	Positif (TS+)	322	123
	Négatif (TS-)	261	463

Cette définition des périodes à risque permet de prévoir les résultats positifs obtenus dans 322/ (322+123) = **72,4% des cas** alors que 27,6% des résultats positifs ont été obtenus sur des périodes non à risqué (faux négatifs). Le nombre d'analyses supplémentaires, évalué comme précédemment, serait au moins égal à 162.

**CONCLUSION**

La comparaison de la définition actuelle et des quatre scénarios proposés conduit au diagramme de type ROC suivant. Il est à noter que l'amélioration du taux de vrais positifs s'accompagne systématiquement de la dégradation du taux de faux positifs. Le choix du scénario idéal nécessite donc de faire la balance entre ces deux types d'information. Il est cependant difficile de conclure avec certitude car les nombreux mois indéterminés des divers scénarios théoriques pourraient modifier les résultats de manière significative.

En analyse préliminaire, il peut être conclu que **la méthode actuelle privilégie un faible taux de faux positifs** (les analyses en périodes à risque ne représentent que 23% des analyses négatives) alors que le scénario 1 privilégie le taux de vrais positifs (80% des tests positifs se retrouveraient pendant les mois à risques)

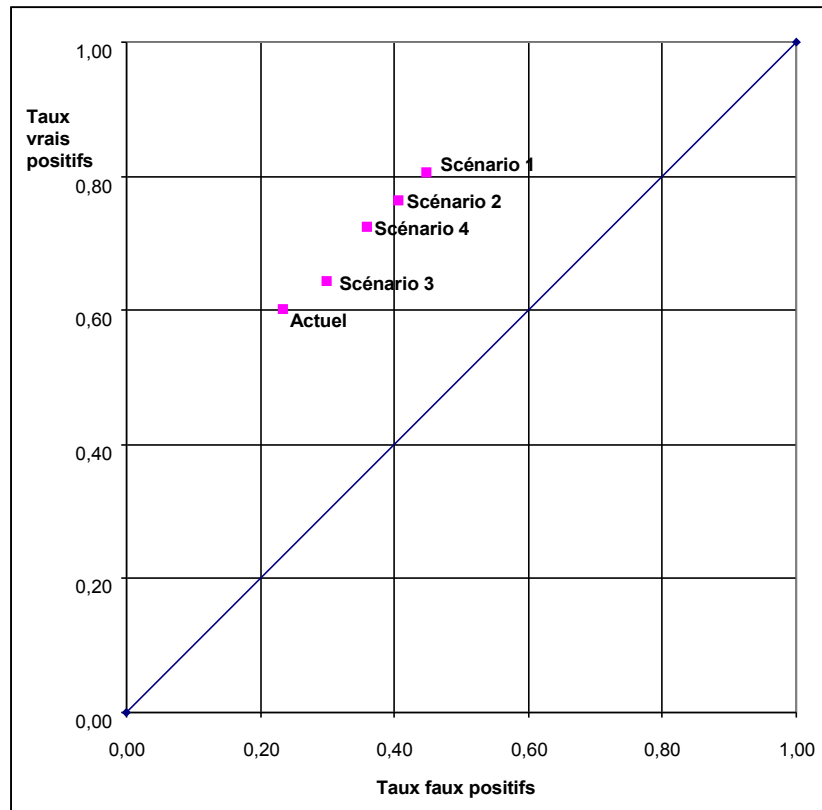


Diagramme de type ROC préliminaire (de nombreux mois restant indéterminés).

Liste des 25 sites pris en compte et nombre d'analyses correspondant.

<b>Zone marine Id</b>	<b>Libellé Zone marine</b>	<b>Nombre d'analyses</b>	<b>Site Id</b>	<b>Libellé site</b>
097	Etang de Salses-Leucate	642	36083002	Parc Leucate 2
087	Arcachon aval	432	34077060	Banc Arguin sud
068	Traicts du Croisic	343	27059002	Le Grand traict
049	Rade de Lorient - Groix	319	23045001	Groix nord
097	Etang de Salses-Leucate	307	36083010	Salses-Leucate
040	Baie de Douarnenez	245	19039001	Kervel
038	Iroise - Camaret	233	19036003	Dinan Kerloc'h
088	Bassin d'Arcachon	231	34077037	Grand Banc
048	Aven - Belon - Laïta	216	22044004	Poulguin
010	Baie de Seine et Orne	199	05010002	Antifer ponton pêche
066	Pen Bé	185	27057018	Pont-Mahé
055	Baie de Quiberon	183	25049001	Men er Roue
065	Estuaire de la Vilaine	178	27057002	Le Halguen
097	Etang de Salses-Leucate	172	36083013	Coudalère
065	Estuaire de la Vilaine	165	27057001	Kervoyal
067	Traict de Pen Bé	144	27057007	Pointe Pen Bé
042	Baie d'Audierne	142	20040001	Tronoen
063	Baie de Vilaine - côte	128	27057004	Le Marescle
047	Baie de Concarneau	124	21043001	Penfoulic
015	Ravenoville - Saint Vaast - Barfleur	114	07015025	Barfleur gisement
018	Cotentin Ouest	104	09021025	Les Minquiers
053	Rivière d'Étel	104	24047006	Beg er Vil
082	Pertuis de Maumusson	101	32071013	Ronce
117	Plaine Orientale	98	43114102	Etang d'Urbino - Centre
105	Etangs Palavasiens	96	37089003	Ingril sud

**Annexe 1 bis :**  
**Analyse n°2 du caractère prédictif de l'historique d'un site sur la base des résultats  
du bio-essai souris depuis 2003**

En raison des changements méthodologiques intervenus dans la mise en œuvre des tests souris qui sont intervenus en 2002, seules les données postérieures à 2002 (2003-2008) ont été conservées pour l'analyse.

Par rapport à l'approche précédente, un scénario qui analyse les résultats sur plusieurs années ne doit pas comporter d'absence d'analyse sur une des années concernées. Par exemple, si un site a été étudié au mois de mars et si le critère inclue 4 ans d'historique, la valeur pour ce site ne sera analysée que si au moins une analyse a été réalisée 5 ans consécutivement. Le résultat le plus récent observé est considéré comme la variable d'intérêt, devant être expliquée par des résultats d'analyses antérieures.

Au total, le fichier de données obtenu comporte 515 lignes, correspondant chacune à un mois, un site et plusieurs années de résultats d'analyses par bio-essai souris. Le nombre de données pouvant être utilisé est différent suivant la période considérée, ainsi étaient disponibles :

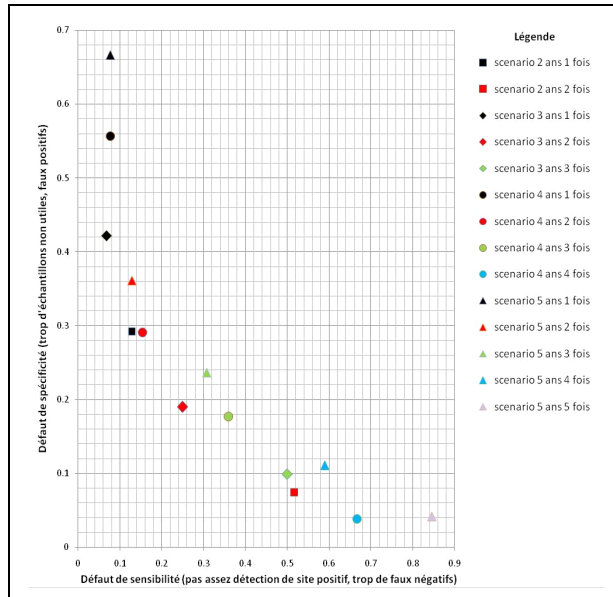
- pour l'historique de 2 ans, 264 données ;
- pour l'historique de 3 ans, 165 données ;
- pour l'historique de 4 ans, 118 données ;
- pour l'historique de 5 ans, 111 données.

Un exemple de calcul est indiqué ci-dessous. Si la règle d'interprétation porte sur 3 ans avec au moins 2 années où des résultats positifs ont été observés sur un même mois, sur un même site, pour un classement en période à risque, les 165 données disponibles peuvent être classées selon le tableau suivant :

	Période à risque	Période sans risque	TOTAL
Observation négative, à la période la plus récente	23	98	121
Observation positive, à la période la plus récente	33	11	44
TOTAL	56	109	165

- La sensibilité est égale à 33/44 ;
- La spécificité est égale à 98/121 ;
- Le taux de faux positifs est égal à 23/121 (ou 1-Sp) (de valeur numérique 0,19) ;
- Le taux de faux négatifs est égal à 11/44 (ou 1-Se) (de valeur numérique 0,25)

Dans le graphique ci-dessous (identique à celui page 4), le point analysé correspond au scénario 3 ans 2 fois, d'abscisse 0,25 et d'ordonnée 0,19. Plus le point est proche de l'origine des axes (0,0) plus le taux de faux positifs et de faux négatifs est faible. Si on affecte la même importance aux faux positifs et aux faux négatifs, le meilleur compromis est celui obtenu avec le point le plus proche de (0,0).



## Annexe 2 : Analyse du caractère prédictif de l'historique d'un site sur la base des résultats de l'analyse chimique et du bio-essai souris

### SUR LA BASE DE L'ANALYSE CHIMIQUE

L'analyse a porté sur les 9678 enregistrements de la base REPHY transmises par Ifremer dans le cadre de cette expertise. Parmi ces données, seules 1348 expriment un résultat en termes d'analyse chimique, exprimé en valeur binaire c'est-à-dire dépassant ou non le seuil réglementaire.

Le nombre de données par site ou par mois est variable. Les données issues d'un site, pour un même mois, une même année sont considérées comme équiprobables et suivent une distribution binomiale avec une probabilité liée au site, au mois et à l'année, et qui peut être estimée à partir des observations.

La question peut être exprimée sous la forme suivante, à savoir si la fréquence d'échantillons positifs mesurée l'année n-1, n-2, n-3, n-4, n-5 pour un même mois et un même site apporte une information pour prédire la fréquence d'échantillons positifs mesurés au cours de l'année n. Afin d'éviter les problèmes d'estimation statistiques d'indépendance des données et une trop grande colinéarité des variables explicatives, si une mesure a été effectuée plusieurs années de suite sur un même site, le même mois, seule la dernière estimation de fréquence est gardée dans le jeu de données. Les valeurs obtenues les années précédentes sont conservées comme variables explicatives de cette fréquence et sont exprimées en fréquence moyenne (même site, même mois).

Le fichier final obtenu pour les analyses chimiques et comportant *a minima* une valeur obtenue au cours des années précédentes, pour le même mois et le même site correspond à 303 analyses ou 102 mesures de fréquences. **Sur ces 102 mesures, 76 sont associées à une mesure l'année antérieure (n-1), 72 à une mesure l'année (n-2), 43 à une mesure l'année (n-3), et 17 l'année (n-4) et 5 à l'année (n-5).** L'estimation pour la mesure de l'effet de l'année n-4 et n-5 est donc jugée peu fiable, et pour l'année n-5 est abandonnée.

Un modèle linéaire généralisé, de type binomial avec une fonction de lien logistique est utilisé (modèle couramment utilisée en épidémiologie).

La relation est de la forme :  $\text{logit}(P) = \log(P/(1-P)) = \alpha + \beta_{n-1}P_{n-1}$

L'analyse menée facteur par facteur montre un bon caractère prédictif des mesures effectuées les années antérieures. Il faut noter que ce caractère prédictif décroît avec le temps, même si la comparaison ne peut être directe en fonction des effectifs différents.

La prédiction de P (année n) peut être effectuée par la relation suivante :

$$P = \frac{\exp(\alpha + \beta_{n-1}P_{n-1} + \beta_{n-2}P_{n-2} \dots)}{1 + \exp((\alpha + \beta_{n-1}P_{n-1} + \beta_{n-2}P_{n-2} \dots))}$$

### RÉSULTATS :

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z )
(Intercept)	-2,41	0,26	-9,112	< 2.10 <sup>-16</sup>
12 mois	2,66	0,37	7,01	<b>1,53.10<sup>-12</sup></b>
(Intercept)	-2,54	0,33	-7,69	1,4.10 <sup>-14</sup>
24 mois	2,27	0,44	5,17	<b>2,34.10<sup>-07</sup></b>
(Intercept)	-2,31	0,377	-6,13	8,52.10 <sup>-10</sup>
36 mois	2,03	0,57	3,58	0,000345
(Intercept)	-2,80	0,67	-4,18	2,9.10 <sup>-05</sup>
48 mois	4,98	1,52	3,26	0,0011



Afin d'évaluer l'utilité d'ajouter une information l'année antérieure, une approche multivariée a été utilisée. Les modèles avec l'information contenue à 12 mois ont été comparés à plusieurs autres modèles contenant plusieurs covariables correspondant aux informations observées au cours des années antérieures.

**Le seul modèle améliorant significativement (au seuil de 5%) la prédiction repose sur les informations des 2 dernières années** (résultats détaillés non présentés).

Les effectifs sont faibles pour analyser l'effet des années >3 (50 valeurs) sur la base des résultats chimiques, donc si l'apport n'est pas significatif cela n'indique pas forcément que pour quelques sites l'information ne soit pas pertinente.

D'autre part, le nombre d'analyses réalisées dans le mois sur un site ou par site est très variable. La précision de l'estimation n'est donc pas la même d'un site à l'autre ou d'une année à l'autre. Par exemple, si une seule analyse a été réalisée, l'information apportée est plus faible que si on en avait effectué 10. Le modèle présenté ici n'en tient pas compte.

#### **SUR LA BASE DU BIO-ESSAI SOURIS**

La même analyse a été réalisée à partir des bio-essai souris sur les 515 données postérieures à 2002 (cf annexe 1bis). Mais ici, la méthode d'analyse repose sur la fréquence de réponses positives. Elle est donc indépendante de la règle d'interprétation.

**Sur ces 515 mesures, 322 sont associées à une mesure l'année antérieure (n-1), 322 à une mesure l'année (n-2), 238 à une mesure l'année (n-3), 194 l'année (n-4) et 122 à l'année (n-5).**

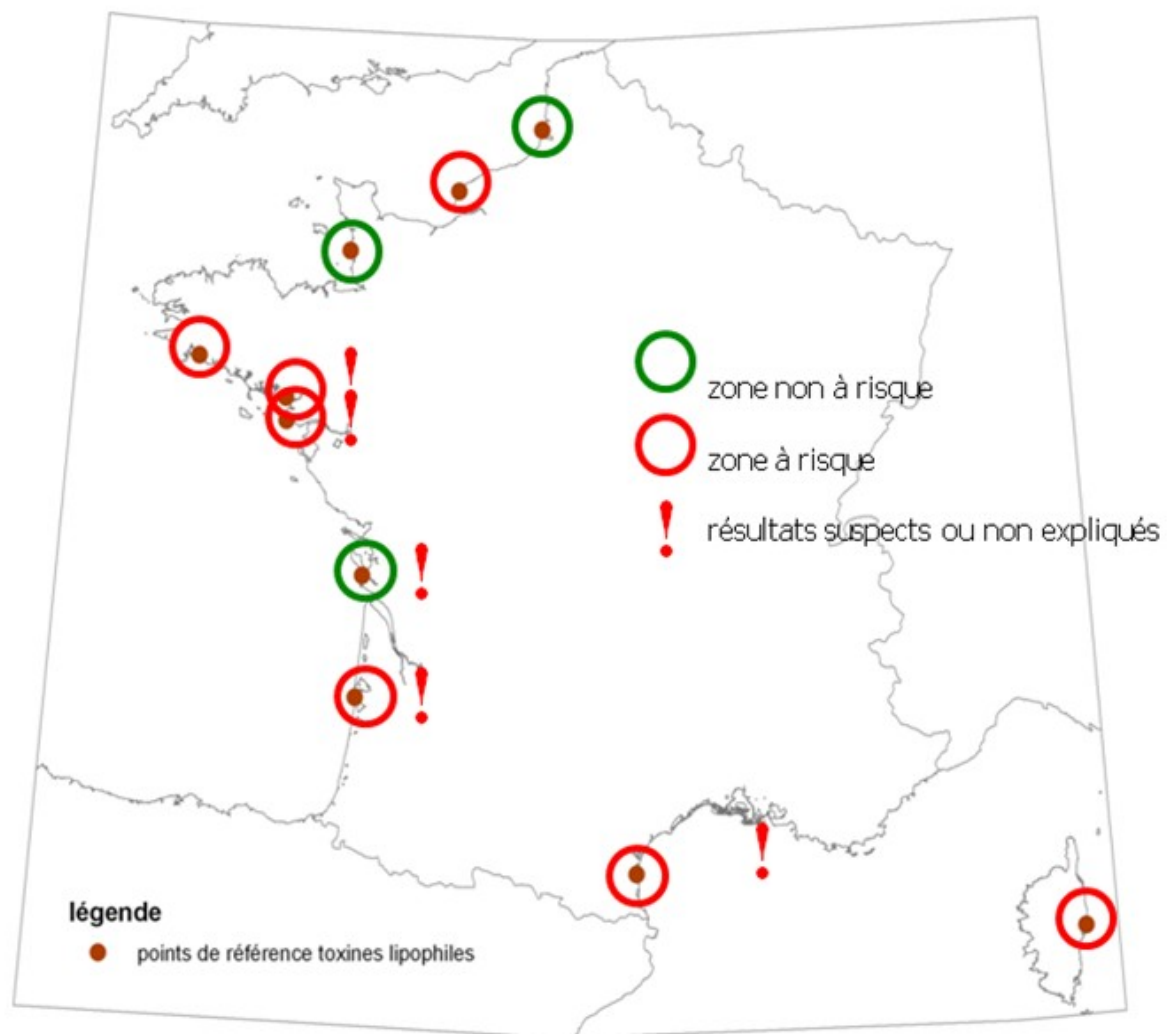
L'association entre la fréquence positive observée l'année la plus récente et la fréquence observée une ou plusieurs années antérieures est toujours trouvée significative, facteur par facteur au seuil de 5%. Dans le cadre d'une analyse multivariée, l'analyse montre qu'il est utile de garder l'information contenue au cours des 3 années antérieures au seuil de 5%, mais qu'au-delà l'apport d'informations ne devient plus intéressant pour mieux prédire la contamination.

Le nombre d'analyses réalisées dans le mois sur un site ou par site est très variable. La précision de l'estimation n'est donc pas la même d'un site à l'autre ou d'une année à l'autre. Par exemple, si une seule analyse a été réalisée, l'information apportée est plus faible que si on en avait effectué 10. Le modèle présenté ici n'en tient pas compte.

### Annexe 3 : Historique des points de référence des phycotoxines lipophiles (source Ifremer)

zone marine		LER	points de référence 2009			suivi depuis	coquillages		commentaires	échantillonnage
code	libellé		id	mnémo	libellé					
006	Baie de Somme - large	LER/BL	3006102	006-P-009	Pointe de St Quentin	2009	moules	bouchot	zone non à risque, n'ayant jamais connu d'épisode toxique	aucun résultat disponible
010	Baie de Seine et Orne	LER/N	5010002	010-P-002	Antifer ponton pêche	2008	moules	struct. spécifique	zone à risque + maxima nationaux <i>Dinophysis</i>	moules régulièrement échantillonnées depuis mars 2008
018	Cotentin Ouest		9021013	018-P-056	Pointe Agon nord	2009	moules huîtres creuses	bouchot culture sur table	zone non à risque pour les coquillages côtiers, n'ayant jamais connu d'épisode toxique	moules régulièrement échantillonnées depuis mars 2009
047	Baie de Concarneau	LER/FBN/CC	21043003	047-P-003	Le Scoré	2008	moules huîtres creuses	filière culture sur table	zone à risque	moules régulièrement échantillonnées
065	Estuaire de la Vilaine	LER/MPL/TM	27057001	065-P-001	Kervoyal	2008	moules	bouchot	zone à risque + résultats de temps de survie courts avec symptômes neurologiques en 2006 et en 2007	moules régulièrement échantillonnées depuis mai 2008
068	Traicts du Croisic	LER/MPL/NT	27059002	068-P-002	Le Grand traict	2006	moules huîtres creuses coques	culture à plat culture sur table gisement naturel	zone à risque + observation de résultats douteux à plusieurs reprises, dont certains avec symptômes neurologiques en 2006, 2007 et 2008	moules (principalement) ou huîtres ou coques ou palourdes régulièrement échantillonnées depuis mai 2006
082	Pertuis de Maumusson	LER/PC/LR	32071013	082-P-009	Ronce	2006	huître creuse coque	culture sur table gisement naturel	zone non à risque, mais observation de résultats douteux à plusieurs reprises avant 2007	huîtres régulièrement échantillonnées depuis avril 2006
087	Arcachon aval	LER/AR	34077060	087-P-009	Banc Arguin sud	2006	moules huîtres creuses coques	gisement naturel culture sur table gisement naturel	plusieurs épisodes toxiques atypiques depuis 2005	moules ET huîtres régulièrement échantillonnées depuis janvier 2006
097	Étang de Salses-Leucate	LER/LR	36083002	097-P-002	Parc Leucate 2	2006	moules huîtres creuses	filière ou corde filière ou corde	zone à risque sur une longue période + observation de résultats douteux à plusieurs reprises,	moules ET huîtres régulièrement échantillonnées depuis janvier 2006
118	Étang de Diana	LER/PAC/CO	43114001	118-P-001	Diana centre	2008	moules huîtres creuses	filière ou corde radeau	zone à risque	moules (principalement) ou huîtres régulièrement échantillonnées depuis janvier 2008

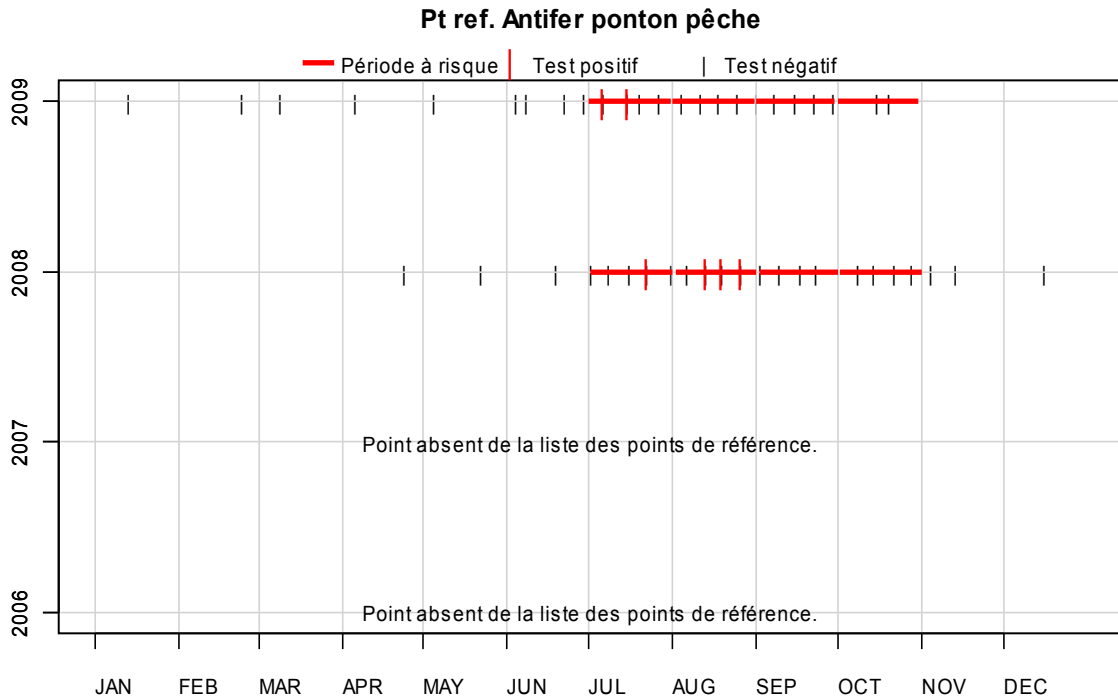
**Annexe 4 :**  
**Carte des points de référence des phycotoxines lipophiles 2009 (source Ifremer)**



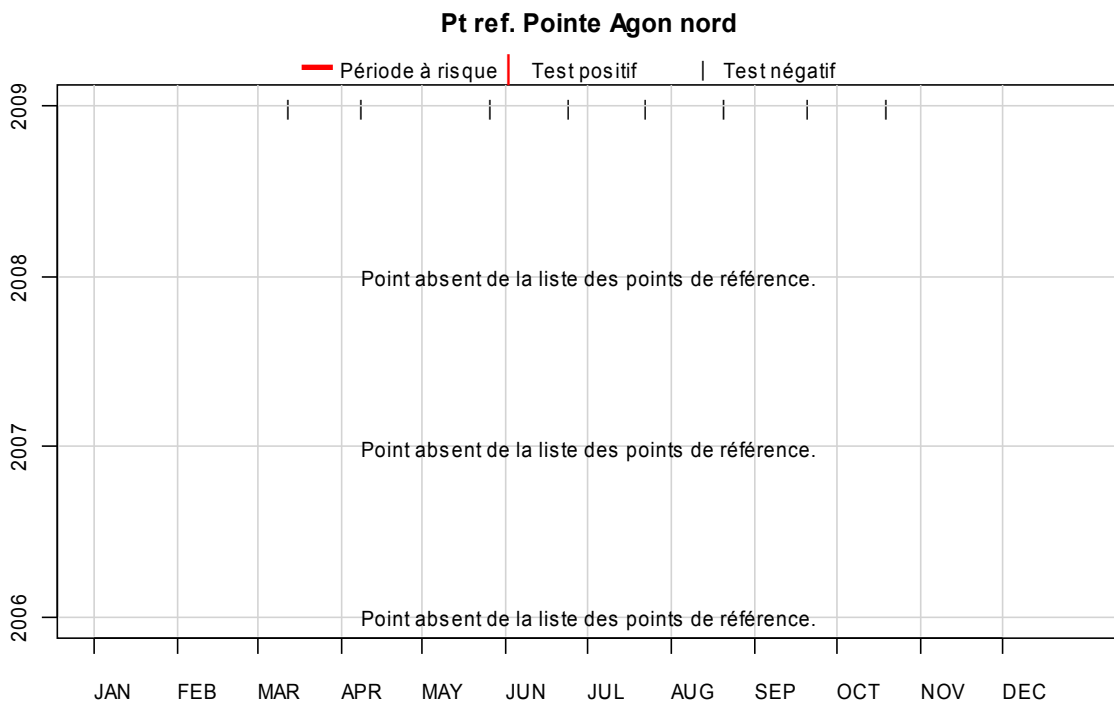
Annexe 5

Résultats issus des 10 des points de référence suivis en 2009 (+ 3 autres points abandonnés en 2009, source Ifremer)

Pointe de St Quentin (Baie de Somme large) : nouveau point 2009, pas de données dans Quadrige<sup>2</sup>



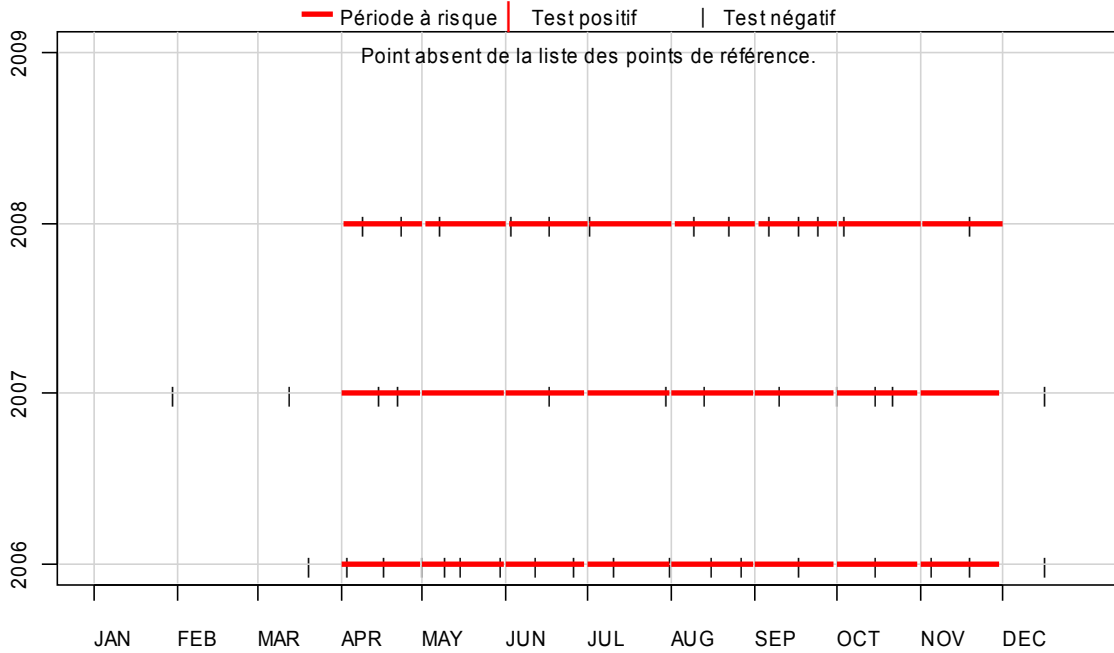
Zone présentant les concentrations en *Dinophysis* les plus élevées  
 → Pas de bio-essai positif en dehors de la période à risque



Zone n'ayant pas de période à risque  
 → Pas de bio-essai positif

Point abandonné en 2009 car ce sont des coquillages de pêche (les points de référence concernent désormais uniquement les gisements côtiers)

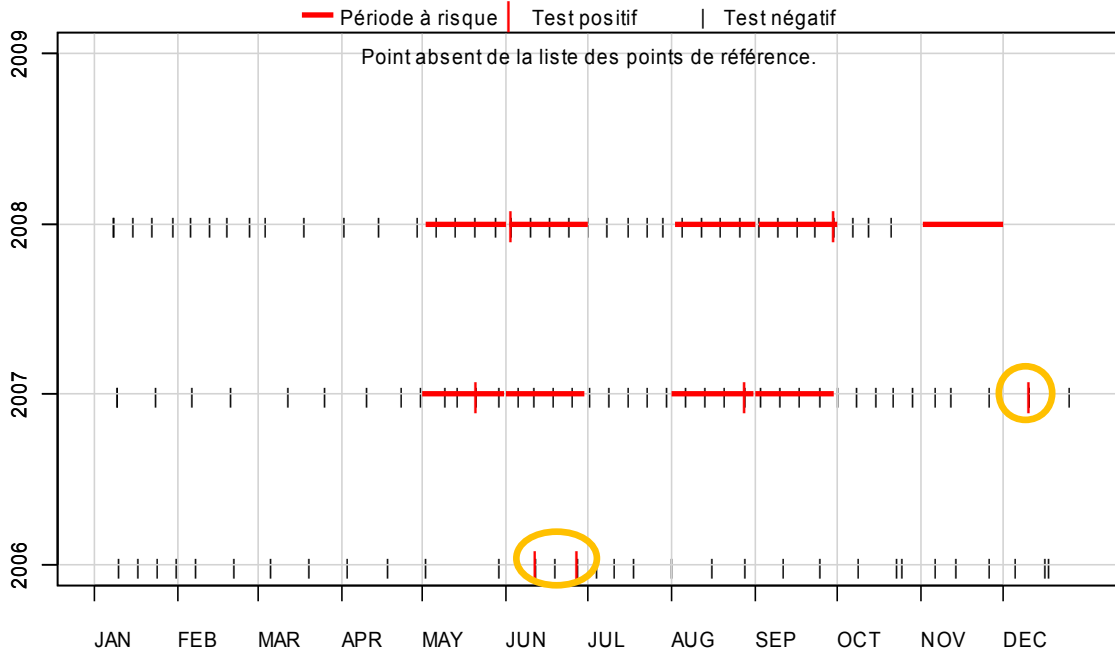
**Pt ref. Basse Jaune**



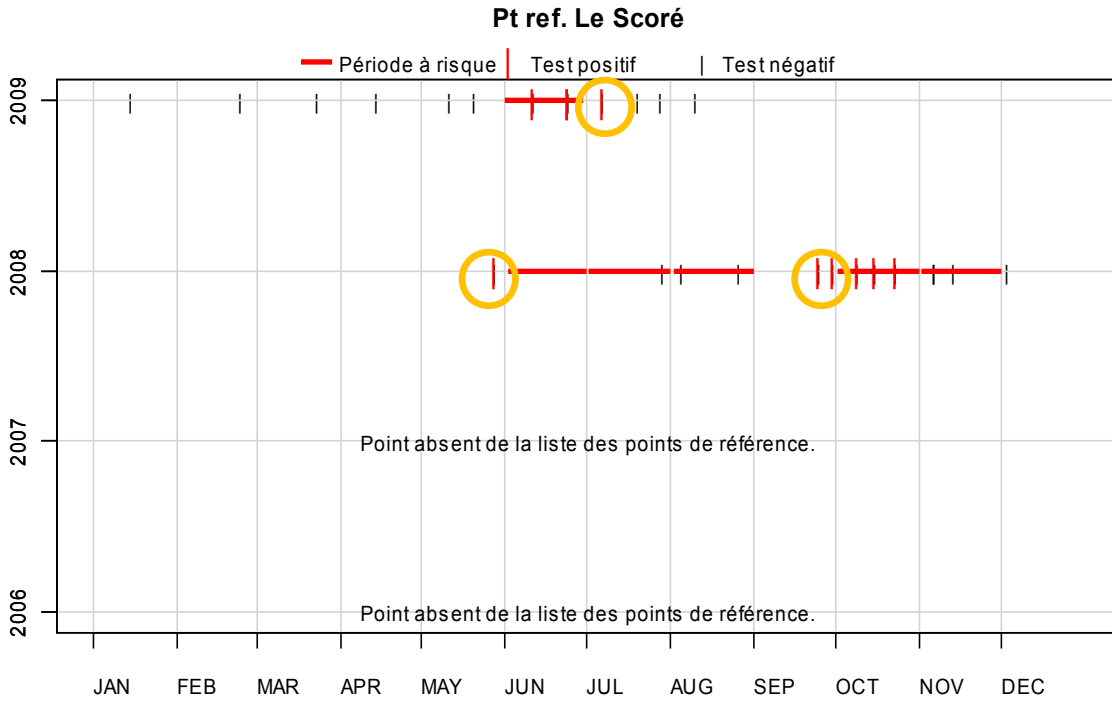
→ Pas de bio-essai positif en dehors de la période à risque

Point abandonné en 2009 car ce sont des coquillages de pêche (les points de référence concernent désormais uniquement les gisements côtiers)

**Pt ref. Les Glénan**

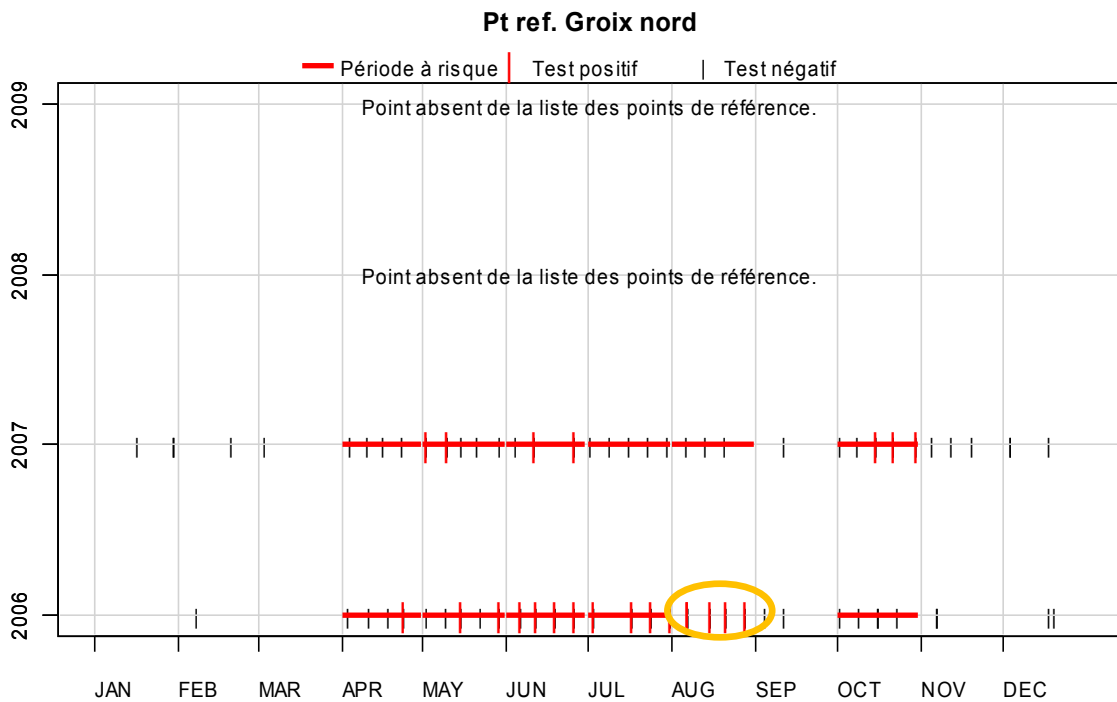


→ 3 bio-essais positifs en dehors de la période à risque : 2 en 2006 et 1 en 2007 (mais les périodes à risque utilisées sont celles des gisements côtiers alors qu'il s'agit de coquillages de pêche surveillés de manière systématique en période de récolte)



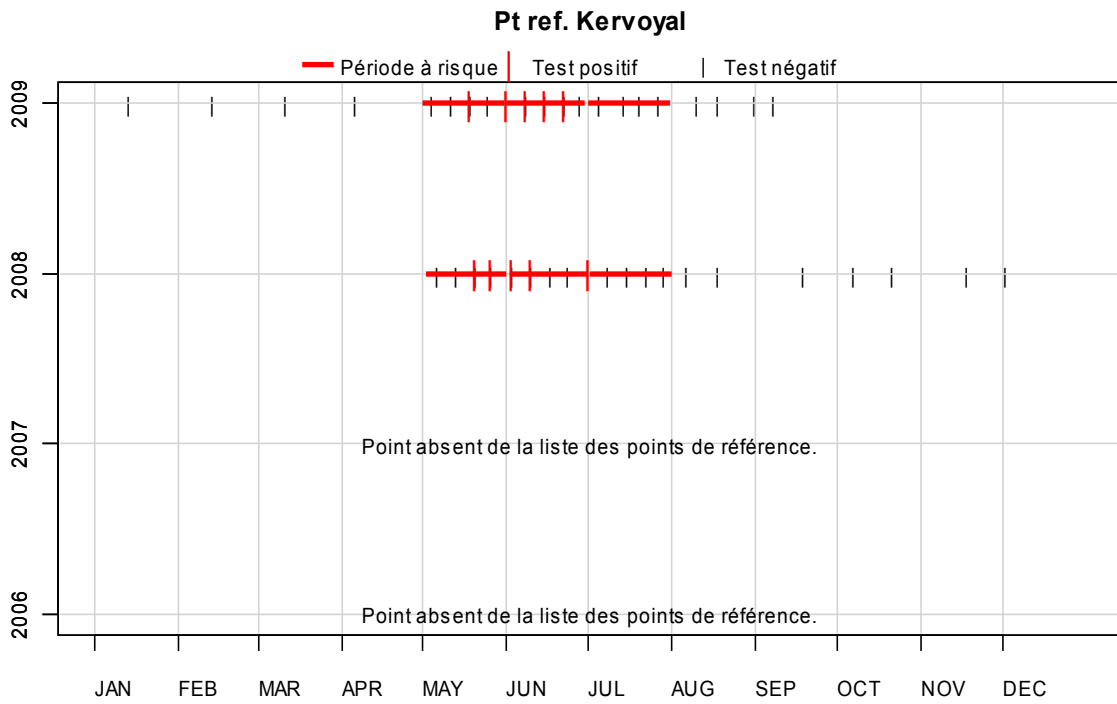
→ 4 bio-essais positifs en dehors de la période à risque : 3 en 2008 et 1 en 2009

Point abandonné en 2009 car il n'y a plus de moules de filière disponible (arrêt de la production)

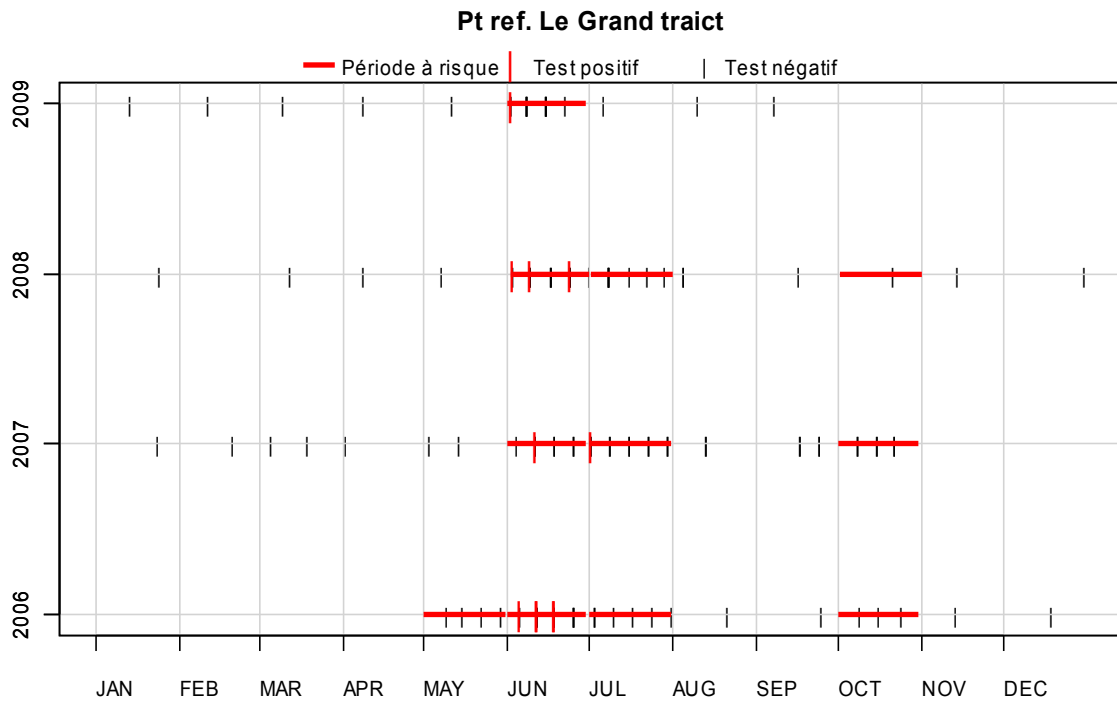


→ 4 bio-essais positifs en dehors de la période à risque en 2006

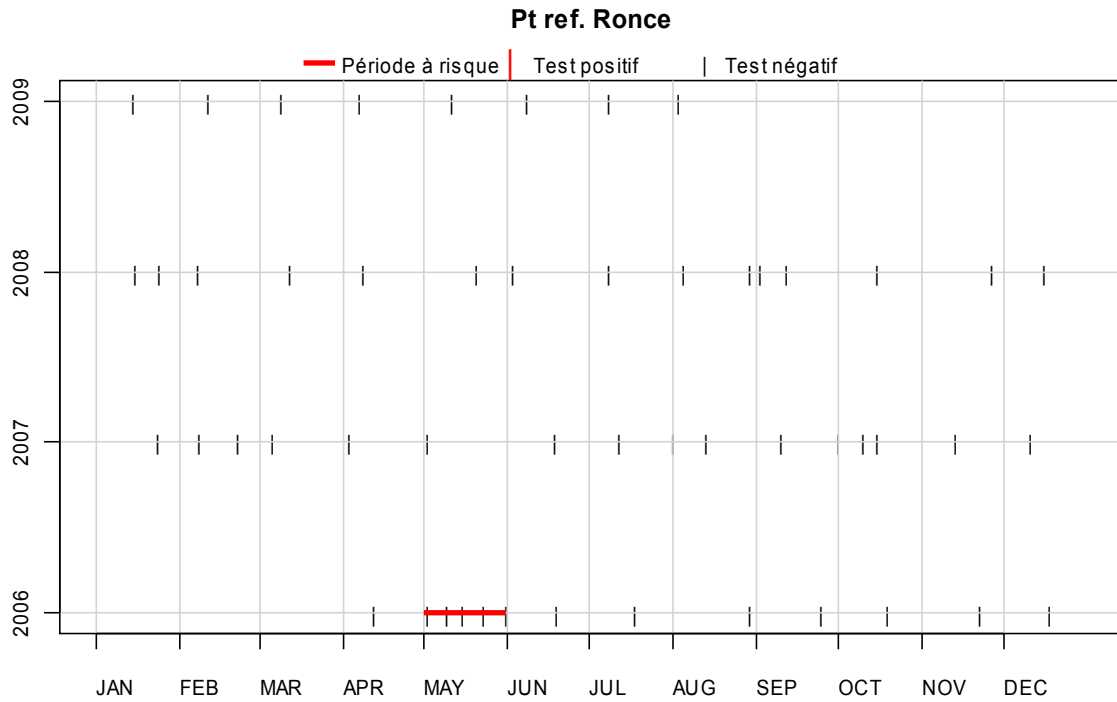




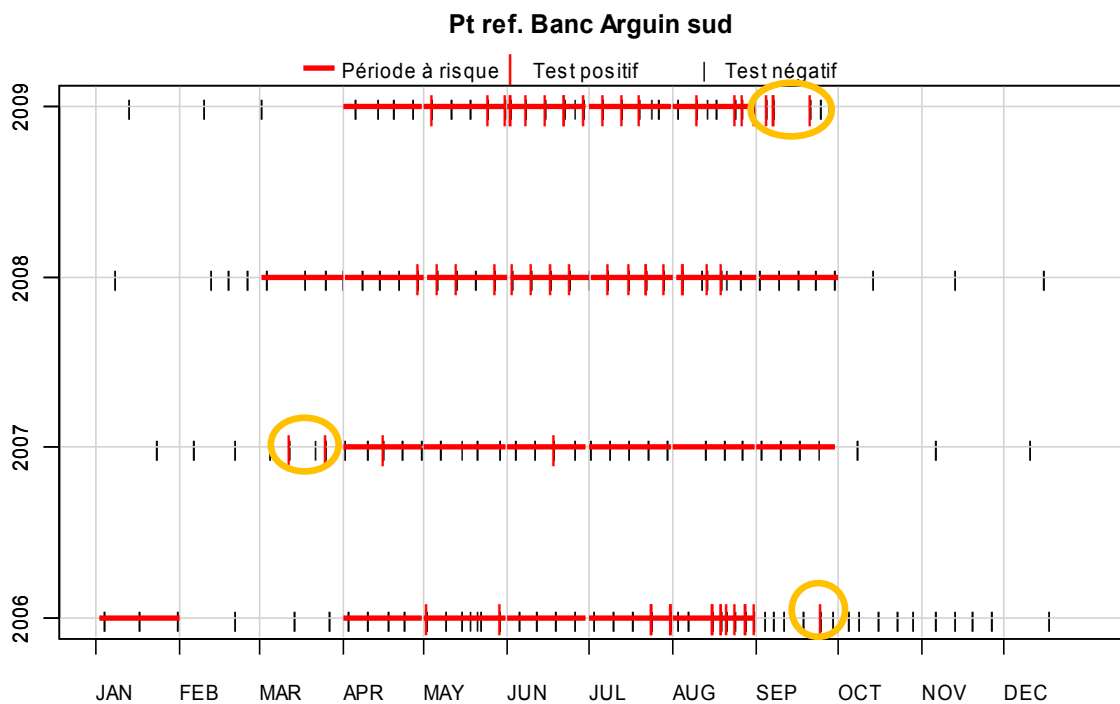
➔ Pas de bio-essai positif en dehors de la période à risque



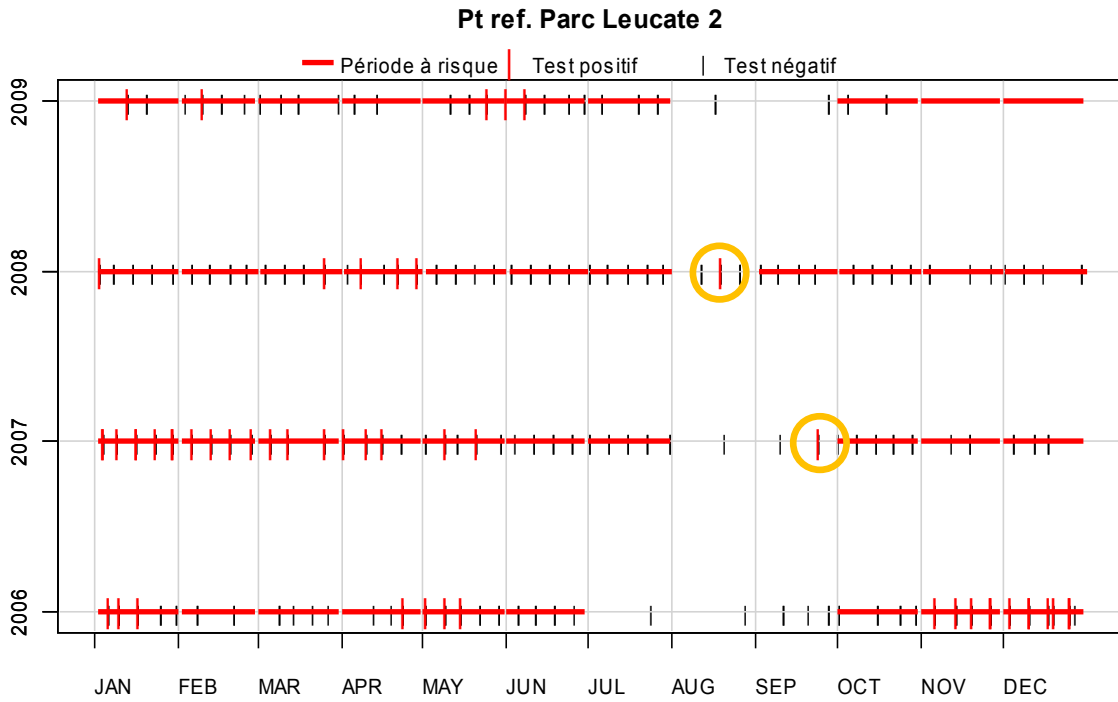
➔ Pas de bio-essai positif en dehors de la période à risque



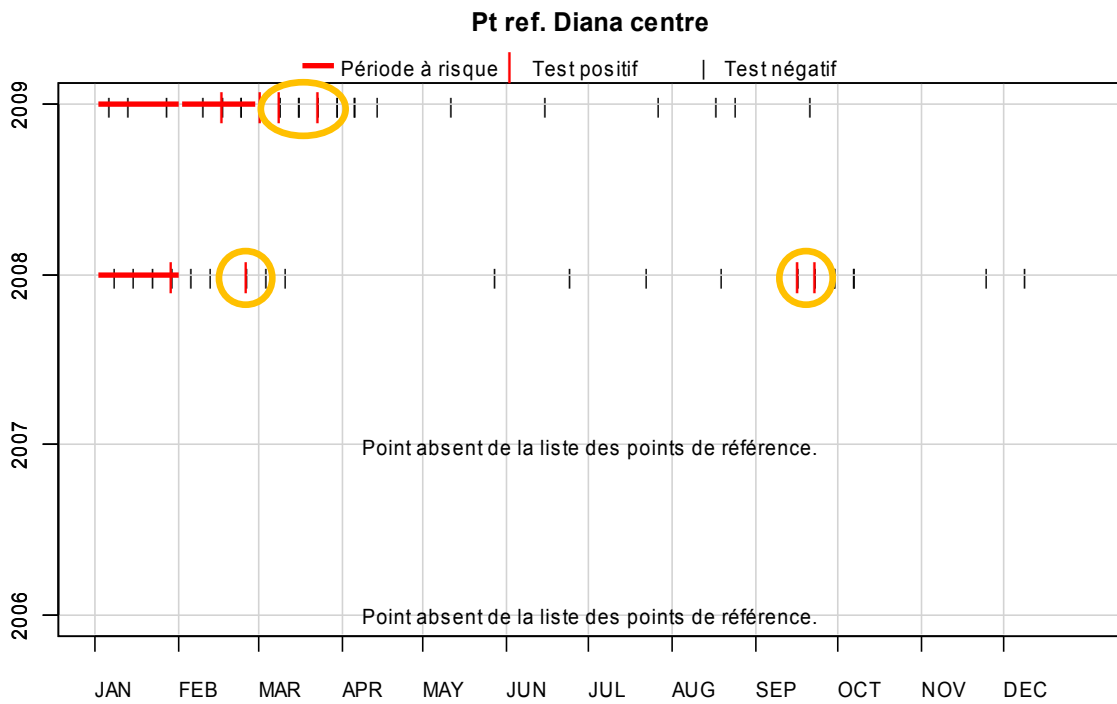
➔ Pas de bio-essai positif en dehors de la période à risque en 2006, Zone non à risque depuis 2007 sans survenue de bio-essai positif.



➔ 6 bio-essais positifs en dehors de la période à risque : 1 en 2006, 2 en 2007 et 3 en 2009



→ 2 bio-essais positifs en dehors de la période à risque : 1 en 2007 et 1 en 2008



→ 5 bio-essais positifs en dehors de la période à risque : 3 en 2008 et 2 en 2009

## Annexe 6

### Exemple de la cellule de gestion mise en place en Irlande, décrite dans le Code of Practice No6 « Monitoring of marine biotoxins in bivalves molluscs », *pre-publication draft*, 2005<sup>9</sup>,

En Irlande, la FSAI (autorité de sécurité alimentaire), le SFPA (autorité de protection de la pêche maritime), le Marine Institute (LNR irlandais) et l'ISA (association des producteurs irlandais) sont sollicités, à la demande de l'un de ses membres, dans les cas suivants :

- Discordance des résultats analytiques avec la tendance locale ou nationale
- Un résultat, positif ou négatif, unique et inattendu
- Résultat douteux ou proche de la limite
- Interruption de l'échantillonnage
- Attribution erronée du statut d'une zone de production
- Les résultats de l'échantillonnage indiquent que la fréquence de prélèvement d'une zone de production ou d'une espèce de coquillage doit être modifiée.

Les recommandations émises par cette cellule de gestion s'appuient sur les éléments suivants :

- Espèce(s) de mollusques bivalves concernée(s)
- Résultats détaillés du bio-essai souris (taux de mortalité, délais de survie, ...)
- Résultats de l'analyse chimique
- Résultats de la recherche de phytoplancton
- Période de l'année/Profil toxinique
- Statut de la zone de production adjacente
- Données historiques pertinentes et rapports d'analyse des échantillons transmis par le Marine Institute
- Toute autre information pertinente.

Les résultats d'autocontrôles mis en œuvre par les professionnels peuvent être pris en compte s'ils ont été réalisés dans des laboratoires désignés par la SFPA ou la FSAI et si les protocoles d'échantillonnage/analyse sont conformes aux exigences de la SFPA, de la FSAI et du Marine Institute.

Les décisions de gestion peuvent être de différentes natures :

- Changement du statut de la zone de production
- Recommandation aux professionnels de fermeture volontaire
- Fermeture de la zone adjacente dans le même bassin
- Augmentation de la fréquence de prélèvement et recherche par des tests chimiques durant une série temporelle intensive
- Diminution de la fréquence de prélèvement selon le profil et la saison
- Ré-ouverture d'une zone
- Autres actions appropriées.

Cette cellule de gestion s'est réunie 89 fois en 2005, 103 fois en 2006 et 35 fois en 2007.

<sup>9</sup> [http://www.fsai.ie/uploadedFiles/Monitoring\\_and\\_Enforcement/Monitoring/Shellfish\\_Monitoring/biotoxin\\_cop.pdf](http://www.fsai.ie/uploadedFiles/Monitoring_and_Enforcement/Monitoring/Shellfish_Monitoring/biotoxin_cop.pdf)