

INSTITUT FRANCAIS DE RECHERCHE
POUR L'EXPLOITATION DE LA MER

B.P. 1049

44037 NANTES CEDEX

VIBRIONS DES COQUILLAGES COMESTIBLES

I. VIVRIO PARAHAEMOLYTICUS ET SES BIOTYPES

II. VIBRIONS NON HALOPHILES

III. ADDENDUM

par

F. CAMPELLO

Rapport à diffusion restreinte n° 33 - septembre 1984

INSTITUT FRANCAIS DE RECHERCHE
POUR L'EXPLOITATION DE LA MER

B.P. 1049

44037 NANTES CEDEX

Avec mes compliments

F. Campello

VIBRIONS DES COQUILLAGES COMESTIBLES

I. VIVRIO PARAHAEMOLYTICUS ET SES BIOTYPES

II. VIBRIONS NON HALOPHILES

III. ADDENDUM

par

F. CAMPELLO

Rapport à diffusion restreinte n° 33 - septembre 1984

VIBRIONS DES COQUILLAGES COMESTIBLES

I. VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS ET SES BIOTYPES

II. VIBRIONS NON HALOPHILES

III. ADDENDUM

par

F. CAMPELLO

I. VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS ET SES BIOTYPES

- A. Etiologie
- B. Répartition
- C. Matériel et méthode
- D. Résultats et discussion
- E. Conclusion

Annexe

Résumé-Summary

Bibliographie (principalement antérieure à 1975)

II. VIBRIONS NON HALOPHILES

- A. Les agents pathogènes. Répartition
- B. Matériel et méthode
- C. Résultats et discussion

Annexe

Résumé-Summary

Bibliographie (succincte)

III. ADDENDUM

- A. Normes japonnaises
 - B. Autres vibrions pathogènes
- Références bibliographiques

I. VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS ET SES BIOTYPES

- La crise que la conchyliculture vient de traverser, en particulier la mytiliculture, durant l'été 1983, nous rappelle que voici une dizaine d'années une nouvelle bactérie marine, dont certaines souches sont pathogènes pour l'homme, était isolée un peu partout dans le monde, causant parfois des épidémies qui ont toutefois épargné notre pays. -

En octobre 1950, à Osaka (Japon) et dans plusieurs villes voisines près de 300 personnes sont victimes d'une gastro-entérite dont l'issue est fatale pour une vingtaine d'entre elles. Les analyses et identifications durent trois ans. FUJINO et al. (1953) pensent qu'il y a eu association entre un Proteus morganii et une "Pasteurella parahaemolytica".

A - ETIOLOGIE

L'agent responsable de ces toxi-infections alimentaires est successivement dénommé "Pseudomonas enteritis" par TAKIKAWA (1968), puis "Oceanomonas" par MIYAMOTO et al. (1961). Mais ce sont SAKAZAKI et al. (1963) qui placent ce micro-organisme parmi les Vibrio, espèce V. parahaemolyticus. Trois biotypes sont individualisés grâce aux travaux de HORIE et al. (1963), repris par RICHARD et al. (1974). SAKAZAKI (1963) fait du deuxième biotype une nouvelle espèce, V. alginolyticus. Le troisième biotype, non pathogène, est différent de V. anguillarum. Selon KATO et al. (1965), cités par SAKAZAKI et al. (1968), les souches obtenues par coprocultures des victimes de gastro-entérites sont β hémolytiques en présence de sang, soit humain du groupe O, soit de lapin et d'une quantité élevée de chlorure de sodium (phénomène Kanagawa positif), alors que celles isolées de la mer et des produits marins ne le sont pas (phénomène Kanagawa négatif). La formule de la gélose pour hémolyse, modifiée par WAGATSUMA en 1968, est donnée par MIYAMOTO et al. (1969).

On a longtemps cru que les désordres causés par ce germe étaient dus à une infection. Son ingestion à la dose de $3 \cdot 10^5$ cellules provoque de la diarrhée et des vomissements accompagnés de fièvre. Mais seules les souches qui possèdent des antigènes capsulaires ou de surface sont capables d'induire de telles réactions. Elles ont une hémolysine active en présence de 7 % de NaCl. Celle-ci joue vraisemblablement un rôle non négligeable par intoxication dans le déclenchement de la gastro-entérite. Cependant, il faut noter que toutes les souches Kanagawa positives ne déclenchent pas le syndrome. Il n'est pas exceptionnel d'isoler des souches Kanagawa négatives à partir de l'environnement, des aliments et des selles des patients, même en période d'épidémie puisque ce sont elles qui

sont les plus abondantes. En plus de la recherche du phénomène Kanagawa réalisable in vitro les chercheurs disposent d'un test in vivo pour mettre en évidence la pathogénicité des V. parahaemolyticus : la réponse de l'anse iléale ligaturée du lapin. Il existe une bonne corrélation (86 %) entre les deux tests. Une étude détaillée du processus, bactériologique et histologique, permet de conclure que l'on est en présence d'un phénomène infectieux. Alors la gastro-entérite à V. parahaemolyticus est-elle une infection ou une intoxication ? Comme TWEDT et BROWN (1973) nous laisserons la question en suspens.

B - REPARTITION

La distribution de ce germe semble universelle.

Les bacilles de TAKIKAWA sont recherchés dans le plancton et les poissons de la zone pélagique du Japon par HORIE et al. (1964). V. parahaemolyticus n'est pas isolé, alors que V. alginolyticus est largement représenté. Les auteurs procèdent ensuite (1967) à sa numération quantitative dans les eaux de mer et d'estuaire.

BAROSS et LISTON (1968) confirment la présence de cet agent responsable de gastro-entérites dans l'eau de mer, les sédiments et les crustacés du Puget Sound (Pacifique nord-est).

Vibrio parahaemolyticus va alors faire l'objet de nombreuses recherches aux Etats-Unis d'Amérique où KRANTZ et al. (1969) mettent en évidence sa pathogénicité pour le crabe bleu adulte (Callinectes sapidus). Quelques années plus tard (1970) FISHBEIN et al. l'isolent de ce même crabe après transformation. Présent sur les crevettes grises du Texas (Penaeus aztecus) selon VANDERZANT et al. (1970) il ne pose pas de problème dans les élevages de ce crustacé (VANDERZANT et NICKELSON, 1973). Il est reconnu comme agent infectieux pour les mollusques bivalves à l'état larvaire ou juvénile (TUBIASH et al., 1965 et 1970). Mais V. parahaemolyticus est surtout recherché dans l'environnement et les produits marins par l'intermédiaire desquels il peut causer des dérangements intestinaux : WARD (1968), BAROSS et LISTON (1970), BARTLEY et SLANETZ (1971), SMITH (1971), MOLENDI et al. (1972), DADISMAN et al. (1972 et 1973), COLWELL et al. (1973), FISHBEIN et WENTZ (1973), VANDERZANT et THOMPSON (1973), KANEKO et COLWELL (1974), KOURANY et al. (1974), KOBURGER et LAZARUS (1974), EARLE et CRISLEY (1975) et VASCONCELOS et al. (1975). Une première toxo-infection alimentaire s'était développée dans le Maryland en 1971, puis une seconde en Caroline du Nord en 1975 due à la consommation d'huîtres crues (RAY et al., 1978).

Des chercheurs l'isolent au Canada : THOMPSON et TRENHOLM (1971), de même que VARGA et HIRTLE (1975) ; au Mexique : ELENA et al. (1974) ; en Australie : BATTEY et al. (1970) ; en Corée : DOKI CHUN et al. (1974) ; au Viet-Nam : NEUMANN et al. (1972) ; en Inde : CHATTERJEE et al. (1970), puis CHATTERJEE et SEN (1974) et au Togo : BOCKEMUHL et TRIEMER (1974).

A la suite d'intoxications alimentaires qui ont frappé des touristes navigant dans la Mer des Antilles, l'espèce est isolée à la Guadeloupe (PAPA, 1980).

Plus près de nous, en Allemagne, et pour la première fois en Europe, ASAKAWA et al. (1970) l'isolent de poissons des Mers Baltique, du Nord et Méditerranée, de même que directement à partir des eaux côtières polluées de cette dernière. Les 1 304 souches isolées sont toutes non hémolytiques. Par contre cet agent n'est pas présent dans les 1822 selles de malades atteints de gastro-entérites aiguës.

Bien qu'isolé de la partie occidentale de la Mer Baltique, V. parahaemolyticus n'est pas mis en évidence dans la partie centrale sud de cette mer par ZALESKI et al. (1975) du fait, peut-être, de la composition du bouillon utilisé. Le germe est en effet sensible à l'antibiotique employé lors de son enrichissement.

V. parahaemolyticus est trouvé dans les eaux de la Mer Noire par ALDOVA et al. (1971) et par LIBINSON et al. (1974), de même que dans les moules qui s'y cultivent par BONEV et ZAKHARIEV (1972), dans l'Adriatique par MUIC et al. (1974) et sur les poissons de la Mer Méditerranée par GIAMMANCO et al. (1973).

Il est à l'origine d'une toxi-infection alimentaire lors d'un vol entre Bangkok et Londres. La souche isolée des personnes atteintes et du crabe servi est hémolytique (Kanagawa positive) et du sérotype 02 : K3 (PEFFERS et al., 1973). Il existe 10 groupes O et 53 groupes K à cette époque. Il arrive qu'un technicien de laboratoire, pourtant entraîné, s'intoxique pendant son travail (SANYAL et al., 1973). Ce germe, considéré comme entérique, peut, par voie orale, causer une gangrène (ROLAND, 1970 et 1971).

Enfin en Europe, il contamine les moules d'Espagne selon RODRIGUEZ-REBOLLO et al. (1971). Il cause des gastro-entérites aiguës après ingestion de moules crues en Italie (PERNA, 1970 ; BABUDIARI et al., 1971). PISANU et COSSEDU introduisent sa recherche dans le contrôle de la qualité hygiénique de ces coquillages en 1971. En Angleterre, il est considéré comme l'un des agents probables d'intoxications alimentaires dont l'étiologie reste indéterminée (HALL et LEWIS, 1967), puis il est isolé de poissons, d'huîtres, de moules et de coques par BARRON et MILLER en 1972. Des huîtres épurées, débarrassées des coliformes, seraient à l'origine de gastro-entérites estivales. Les auteurs ne donnent pas de résultats quantitatifs. Des estivants de la côte sud sont victimes d'une gastro-entérite après avoir consommé de la chair de crabe cuite en juillet 1973, selon HOOPER et al. (1974). Le sérotype 01/K56 hémolytique est incriminé. En Hollande, V. parahaemolyticus est présent dans tous les produits de la mer, aussi bien poissons et crustacés que moules et huîtres (KAMPELMACHER et al., 1970 et 1972). En Allemagne, la recherche de cet entéropathogène est effectuée à la fois dans le milieu marin, les poissons et les selles des diarrhéiques. Alors qu'il est toujours isolé des premiers, il n'est jamais retrouvé chez les humains (NAKANISHI et al., 1967 et 1968 ; LEISTNER et HECHELMANN, 1974).

Ce germe a été isolé en France plusieurs fois quand il a été demandé à notre laboratoire d'en effectuer la recherche et l'identification pour l'information du Service des Contrôles de notre Etablissement. Depuis, il a été isolé au Mans (RICHARD et al. 1981) et à Marseille d'un voyageur de retour du sud-est asiatique (PELOUX et al. 1981). A Brest, il a intoxiqué 50 personnes qui participaient à un repas de 200 couverts. La souche isolée sur géloses pour Enterolacteriaceae est identifiée à V. parahaemolyticus hémolytique (BOURDON et al. 1983).

C - MATERIEL ET METHODE

Nos recherches sont effectuées exclusivement à partir de coquillages comestibles : huîtres (Crassostrea gigas et C. angulata) moules (Mytilus edulis et M. galloprovincialis) et amandes (Pectunculus glycymeris) dont certains se consomment à l'état cru, prélevés dans toutes les zones de production (fig. 1) et à divers stades entre l'élevage, ou l'importation, et la vente au détail.

Le prélèvement aseptique d'une vingtaine de grammes, à 0,1 g près, constitué à la fois par le corps du mollusque et par son liquide intervalvaire, est broyé pendant une minute en présence d'un diluant alcalin salé (voir annexe) dans la proportion de 1/5 (poids/volume). Nous ensemençons 1 ml du broyat et 1 ml des dilutions décimales successives jusqu'à 10^{-6} , en triple exemplaire, dans des bouillons d'enrichissement alcalins salés à partir des formules de certains auteurs et après modification (annexe).

Ces enrichissements, en tubes vissés, sont incubés horizontalement à 37°C pendant 18 à 24 heures. L'isolement est effectué sur une gélose au thiosulfate-citrate-sels biliaires-saccharose (T.C.B.S.) selon KOBAYASHI et al. (1963), commercialisée à l'état déshydraté et additionnée de 2 % de NaCl. Nous étalons une anse prise en surface, sans agitation, dans les derniers tubes qui présentent une culture en voile. Après incubation à 37°C pendant 18 heures, plusieurs colonies sont purifiées (généralement 5 par boîte) jaunes ou vertes, sur une gélose nutritive alcaline (annexe).

Les germes recherchés, bacilles à Gram négatif, non sporulés, sont facilement séparés des germes voisins à l'aide de quelques tests simples (tabl. 1). Nous n'utilisons pas le test de l'hydrolyse du tween 80 qui est aussi un caractère différentiel selon CHAKRA-BARTY et al. (1970). Ils sont oxydase positifs. Certains caractères biochimiques sont révélés à l'aide d'une galerie API 20 E si la suspension des germes est effectuée dans un diluant convenablement salé.

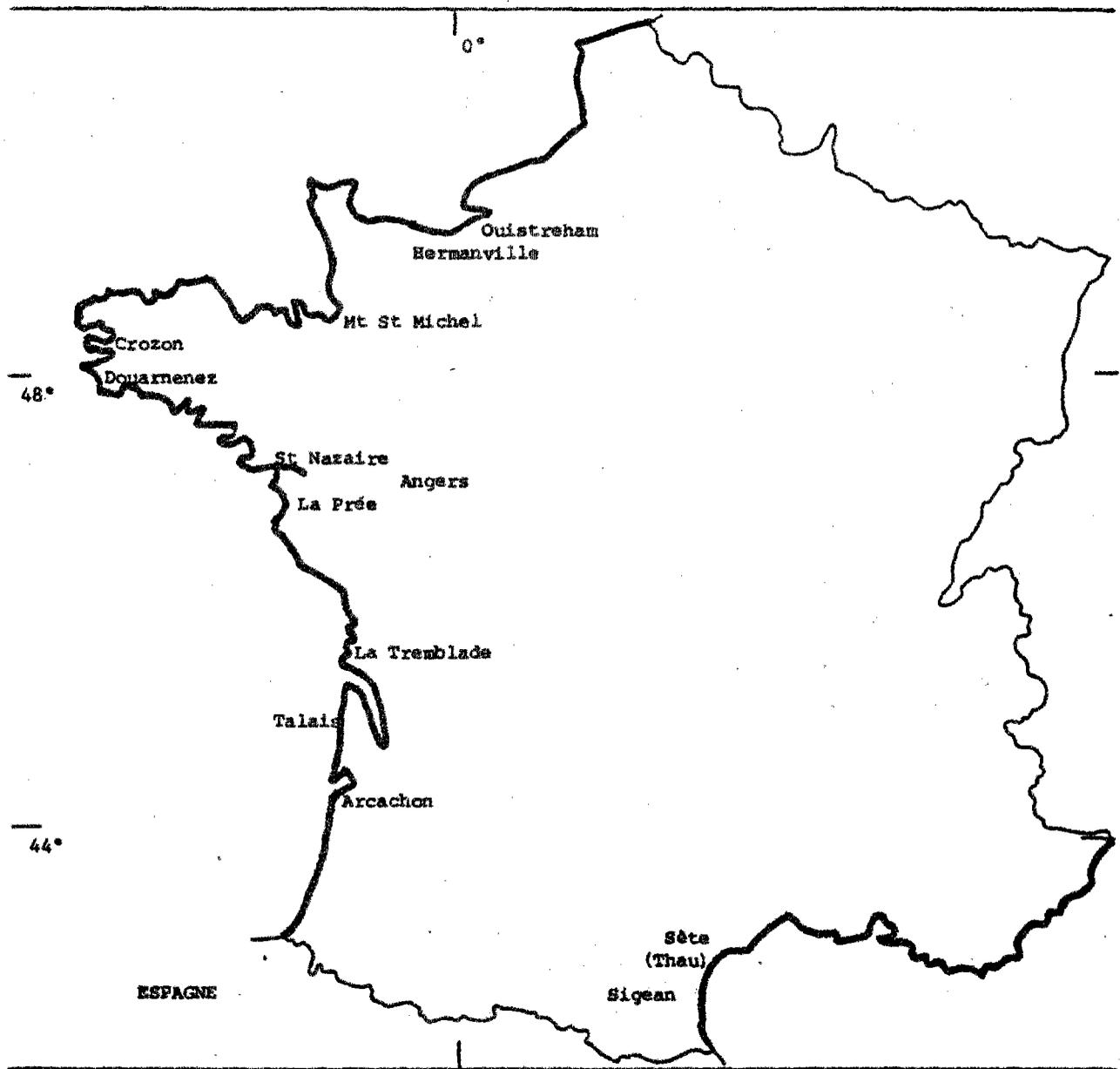


Figure 1

TESTS	<u>Enterobacteriaceae</u>	<u>Pseudomonas</u>	<u>Aeromonas</u>	<u>Plesiomonas</u>	<u>Vibrio</u>
Oxydase	-	+	+	+	+
Glucose (fermentation)	+	-	+	+	+
L.D.C.			-	+	+
A.D.H.			+	+	-

Tabl. 1 - Tests généraux de différenciation entre le genre Vibrio et les genres voisins en milieux salés à 3 % (des exceptions peuvent être rencontrées)

Dans le genre Vibrio figurent des espèces qui ont une action pathogène sur les humains et les animaux et des espèces qui n'en ont pas. A l'époque de nos recherches, la clé de détermination présomptive que nous utilisions a été plusieurs fois modifiée, puis elle est devenue la suivante :

. croissance en eau peptonée salée à 6 % :

- Agglutination en sérum 01
 - + acétoïne
 - V. cholerae
 - + V. cholerae biotype El Tor
 - vibrions non agglutinables (N.A.G. ou V.N.C.)

. croissance en eau peptonée salée à 10 % :

- + V. alginolyticus
- V. parahaemolyticus

Nous considérons, avec TWEDT et al. (1969), comme pathogènes les V. parahaemolyticus qui cultivent à 42° C en eau peptonée salée à 3 %. Ce caractère n'est pas parfaitement discriminant (FUJINO et al., 1974) mais il a été utilisé par SAKAZAKI en 1969, cité par CHATTERJEE et al. (1970). Nous n'avons jamais cherché le phénomène Kanagawa. Notre méthodologie s'est limitée à expérimenter les deux sérums anti-Vibrio parahaemolyticus -types 1 et 2- obligeamment prêtés par le Dr DODIN (Institut Pasteur à Paris).

D - RESULTATS ET DISCUSSION

Nos résultats figurent dans le tableau 2.

Date	Produits	Origine	Identification	
1972	juillet	huîtres	Arcachon	<i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Aeromonas salmonicida</i> <i>Plesiomonas shigelloides</i> <i>Pseudomonas</i> spp.
		huîtres	Talais	<i>Vibrio alginolyticus</i> <i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Aeromonas salmonicida</i> <i>Plesiomonas shigelloides</i>
		moules	Talais	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> <i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Aeromonas salmonicida</i>
	août	huîtres	La Tremblade	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> <i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Aeromonas salmonicida</i> <i>Plesiomonas shigelloides</i>
		huîtres	Thau	<i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Aeromonas salmonicida</i> <i>Plesiomonas shigelloides</i>
		moules	Thau	<i>Aeromonas salmonicida</i> <i>Plesiomonas shigelloides</i> <i>Pseudomonas</i> spp.
		huîtres	Sigeac	<i>Aeromonas salmonicida</i> <i>Plesiomonas shigelloides</i>
		moules	Sigeac	<i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Plesiomonas shigelloides</i>
		moules	Espagne	<i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Aeromonas salmonicida</i> <i>Pseudomonas</i> spp.
	1973	octobre	moules	St Nazaire
moules			Mt St Michel	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
moules			grossiste ⁺	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
moules			supermarché ⁺	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
moules			détaillant ⁺	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
moules			La Préa	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
1974	juin	huîtres	Arcachon *	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
		huîtres	Arcachon	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
	juillet	moules	Hermanville	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
		moules	Ouistreham *	<i>Vibrio alginolyticus</i>
		huîtres	La Tremblade	<i>Vibrio alginolyticus</i>
		huîtres	La Tremblade *	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
		huîtres	Arcachon	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
huîtres	Arcachon *	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>		
1976	juillet	moules	Crozon	<i>Vibrio alginolyticus</i>
		amandes	Douarnenez	<i>Vibrio alginolyticus</i>

+ à Angers

* zone insalubre

Tabl. 2 - Vibrions halophiles modérés et germes voisins dans des coquillages comestibles

Au début des recherches, nous identifions des Aeromonas, des Plesiomonas et des Pseudomonas comme d'autres avant nous (BONEV et ZAKHARIEV, 1972). Nous ne les avons plus fait figurer par la suite.

Vibrio parahaemolyticus est présent, parfois en nombre très élevé, durant les mois d'été. Plusieurs sont pathogènes suivant le critère utilisé. L'enrichissement à 37°C ne permet pas le dénombrement des souches pathogènes exclusivement. Les recherches ne sont pas poursuivies pendant les mois d'hiver bien que ce germe puisse être retrouvé après entreposage à des températures basses (FISHBEIN et al., 1970 ; VANDERZANT et NICKELSON, 1970 ; MATCHES et al., 1971 ; THOMPSON et TRENHOLM, 1971 ; BEUCHAT, 1973 et JOHNSON et al., 1973).

Selon nos propres expériences, à 7°C en 24 heures, la population normalement présente dans les coquillages du commerce subit une chute de plusieurs unités logarithmiques. Les résultats, variables, dépendent peut-être de la flore cryophile accompagnatrice non identifiée. Ce micro-organisme est aussi isolé par nous des "chambres" présentes sur la face interne des valves de certaines huîtres, appelées pour cette raison "chambrées".

Etant donné l'aspect "qualité hygiénique" de notre travail, nous ne cherchons pas particulièrement à mettre en évidence le troisième biotype de V. parahaemolyticus.

Cet agent infectieux est très peu connu des hygiénistes en 1974, de même que V. alginolyticus qui peut être pathogène pour l'homme. Il n'en est pas tenu compte dans l'arrêté du 21 décembre 1979, publié au J.O. du 19 janvier 1980, relatif aux critères microbiologiques des denrées animales ou d'origine animale. A notre connaissance, sa présence dans les coquillages ne semble pas induire de gastro-entérite chez les consommateurs. Le niveau de nos déterminations (espèce) n'est sans doute pas suffisant. Les sérotypes pathogènes sont souvent mêlés à d'autres non pathogènes si l'on se réfère au phénomène Kanagawa (MOLENDI et al. 1972). Mais nous ne sommes pas les seuls à ne pas pousser notre diagnostic aussi loin. Le sérotypage n'a d'intérêt qu'en épidémiologie. Néanmoins, nous estimons que la présence des sérotypes pathogènes, seuls dangereux, doit être recherchée, l'espèce n'étant pas un niveau suffisant.

La méthode que nous employons donne des résultats bien plus souvent positifs que ceux de nos collègues (tabl. 3).

L'aliment aurait-il une influence dans le déclenchement des intoxications ? La chair des mollusques est différente de celle des poissons et des crustacés. Les intoxications se développent surtout après ingestion de ces deux derniers produits à l'état cru ou légèrement cuit.

	HOLLANDE		CANADA		FRANCE	
	V.p.	V.a.	V.p.	V.a.	V.p.	V.a.
Huîtres	0.0	6.8	13.6	/	63.6	18.2
Moules	2.4	2.4 env	/	/	61.5	15.4
Amandes	/	/	/	/	0.0	100.0

Tabl. 3 - Pourcentages d'isolement de Vibrio parahaemolyticus et de V. alginolyticus d'après la littérature et nos résultats.

Nous partageons l'opinion de BARROW et MILLER (1972) selon laquelle la dose infectieuse (du sérotype pathogène) doit probablement être grande. Ces quatre années au cours desquelles nous avons recherché Vibrio parahaemolyticus et V. alginolyticus nous n'avons pas eu connaissance de diarrhée estivale dans notre pays.

L'halophilie modérée de ce micro-organisme en fait un germe estuarien par excellence. Il est sans aucun doute l'un des membres de la flore normale des mers côtières. Sa répartition est limitée par la température, la salinité et son association avec le zooplancton (HORIE et al. 1964 ; KANEKO et COLWELL, 1973 et 1975, a ; SAYLER et al. 1976). Sa valence écologique doit être assez élevée puisqu'il a été isolé de plancton d'eaux douces (SARKAR et al. 1983).

E - CONCLUSION

D'une façon générale, les vibrions ne sont pas des hôtes normaux du tube digestif des animaux à sang chaud. Naturellement présents et/ou rejetés dans les milieux extérieurs, ils semblent, en particulier V. parahaemolyticus, indépendants et insensibles à une contamination fécale légère ou importante puisqu'ils sont isolés des zones conchylicoles aussi bien salubres qu'insalubres. KANEKO et COLWELL (1975, b) n'avaient pas trouvé de corrélation avec les coliformes fécaux. Les exigences de leurs deux familles ne sont sans doute pas compatibles.

Il ne semble pas que V. parahaemolyticus soit à l'origine d'intoxications alimentaires dans notre pays, ni par l'intermédiaire des coquillages, ni par celui des poissons consommés légèrement salés et fumés. Néanmoins, la vigilance doit être la règle, d'autant que nous savons l'éliminer, le cas échéant.

Sa présence doit être recherchée par des techniques sans cesse améliorées, impliquant la mise en évidence des sérotypes, dans tous les produits qui peuvent être favorables à son développement (pH >6 et salinité < 10 %) dans des quantités aussi faibles que possible pour en détecter le plus grand nombre possible.

Mots clefs : Vibrio parahaemolyticus, Vibrio alginolyticus, coquillages comestibles, huîtres, moules, amandes, dénombrement, milieux de culture.

Annexe

Composition des milieux utilisés, en g/l d'eau distillée.

1. Diluant.

Tryptone	1
NaCl	30

Ajuster le pH à 8,0 avec NaOH.
Autoclaver à 115°C pendant 20 mn.

2. Bouillon d'enrichissement.

D'après TWEDT et NOVELLI (1971)

Peptone	20
Extrait de levure	2
Amidon de blé	5
NaCl	30

Ajuster le pH à 8,0 avec NaOH.
Autoclaver à 115°C pendant 20 mn.

Au moment de l'emploi, ajouter quelques gouttes d'une solution de pénicilline G de manière à avoir 5 UI.ml⁻¹.

3. Gélose d'isolement.

Gélose T.C.B.S. (thiosulfate-citrate-sels biliaires-saccharose).

Suivre les instructions du fabricant, après avoir porté la teneur en NaCl à 3 %.

4. Gélose pour purification.

Peptone sans indole	20
Extrait de levure	2
NaCl	30
Gélose	15

Ajuster le pH à 8,0 avec NaOH.
Autoclaver à 115°C pendant 20 mn.

Résumé

Pour l'information du Service des Contrôles relevant de notre Institut, qui n'en effectuait pas la recherche systématique, il a été demandé à notre laboratoire de mettre en évidence la présence éventuelle des biotypes de vibrions halophiles décrits comme pouvant avoir une action pathogène sur l'homme. Aucun syndrome diarrhéique n'a été signalé à cette époque, bien que les dénombrements effectués aient révélé des valeurs élevées dans la majorité des échantillons de coquillages comestibles soumis à l'analyse.

Summary

Ten years ago, the Institute's "Service des Contrôles" didn't carry out the systematical research of Vibrio parahaemolyticus and V. alginolyticus. For its information, our laboratory was requested about the possible presence of these bacteria known for their pathological action on men. Not any diarrhea was mentioned at that time, although the numerations were high in the majority of the samples of analysed shells.

Bibliographie

- ALDOVA (E.), ZAKHARIEV (Z.A.), DINEV (T.S.) et ZLATONOV (Z.T.), 1971.-
Vibrio parahaemolyticus in the Black Sea.- Zbl. Bakterirol. Parasitenkunde Infekt.- Krankh. Hyg. 1, A, 218 (2) : 176 - 188.
- ASAKAWA (Y.), HECHELMAN (H.) et LEISTNER (L.), 1970 .- Vorkommen von Vibrio parahaemolyticus bei Seefischen in der Ost- und Nordsee sowie in Mittelmeer .- Die Fleischwirtschaft, 5 : 682-685
- BABUDIERI (B.), ROTTINI (G.D.) et SCHREIBER (F.), 1971.- Primo isolamento di vibrioni alofili, serologicamente correlati a Vibrio parahaemolyticus da pesci del Golfo di Trieste.- Boll. Ist. sieroterap. Milan., 50 (5) : 403 - 408.
- BAROSS (J.) et LISTON (J.), 1968.- Isolation of Vibrio parahaemolyticus from the North west Pacific.- Nature, 217 (5135) - 1263 - 1264.
- _____, 1970.- Occurrence of Vibrio parahaemolyticus and related haemolytic vibrios in marine environments of Washington State.- Appl. Microbiol., 20 (2) : 179 - 186.
- BARROW (G.I.) et MILLER (D.C.), 1972.- Vibrio parahaemolyticus : a potential pathogen from marines in Britain.- Lancet, 7748 : 485 - 486.
- BARTLEY (G.H.) et SLANETZ (L.W.), 1971 .- Occurrence of Vibrio parahaemolyticus in estuarine waters and oysters of New Hampshire .- Appl. Microbiol., 21 (5) : 965-966
- BATTEY (Y.M.), WALLACE (R.B.), ALLAN (B.C.) et KEEFE (B.M.), 1970.- Gastroenteritis in Australia caused by marine vibrios.- Med. J. Australia, 1 : 430.
- BEUCHAT (L.R.), 1973.- Interacting effect of pH, temperature and salt concentration on growth and survival of Vibrio parahaemolyticus.- Appl. Microbiol., 25 (5) : 844 - 846.

- BOCKEMUHL (J.) et TRIEMER (A.), 1974.- Ecology and epidemiology of Vibrio parahaemolyticus on the coast of Togo.- Bull. Organism. mond. Santé, 51 (4) : 353 - 360.
- BONEV (S.) et ZAKHARIEV (Z.), 1972.- Mise en évidence de quelques Vibrio, Aeromonas et Plesiomonas chez des moules de la Mer Noire.- Epidemiol. Mikrobiol. infect. Bolesti, 9 (1) : 42 - 47 (en bulgare).
- BOUDON (A.), RICHARD (C.), LE CORRE (C.) et COLOMBO (P.), 1983.- Premier cas autochtone de syndrome diarrhéique à Vibrio parahaemolyticus en France. Données bactériologiques, cliniques et épidémiologiques.- Méd. Mal. infect., 13 (7) : 443-447
- CHAKRABARTY (A.N.), SATI (A.W.) et PRAMANIK (M.K.), 1970.- The hydrolysis of tween 80 by vibrios and aeromonads.- J. Appl. Bacteriol., 33 (2) 397 - 402.
- CHATTERJEE (B.D.), GORBACH (S.L.) et NEOGY (K.N.), 1970.- Vibrio parahaemolyticus and diarrhoea associated with non-cholera vibrios.- Bull. Organism. mond. Santé, 42 (3) : 640 - 643.
- CHATTERJEE (B.D.), NEOGY (K.N.) et CHOWDHURY (B.R.R.), 1970.- Drug sensitivity of Vibrio parahaemolyticus isolated in Calcutta during 1969.- Bull. Organism. mond. Santé, 42 (4) : 640 - 641.
- COLWELL (R.R.), LOVELACE (T.E.), WAN (L.), KANEKO (T.), STALEY (T.), CHEN (P.) et TUBIASH (H.), 1973.- Vibrio parahaemolyticus : isolation, identification, classification, and ecology.- J. Milk. Ed. Technol., 46 (4) 202 : 213.
- DADISMAN (T.A.jr.), NELSON (R.), MOLENDEN (J.R.) et GARBER (H.J.), 1972.- Vibrio parahaemolyticus in Maryland.- Amer. J. Epidemiol., 96 (6) : 414 - 426.
- 1973.- Vibrio parahaemolyticus in Maryland : clinical and epidemiologic aspects.- J. Milk. Ed. Technol., 36 (2) : 111 - 112.

- DOKI CHUN, JAE KYU CHUNG, SUNG YOUNG SEOL et RYUNBIN TAK, 1974.- Vibrio parahaemolyticus in the Republic of Korea.- Amer. J. trop. Med. Hyg., 23 (6) : 1125 - 1130.
- EARLE (P.M.) et CRISLEY (F.D.), 1975.- Isolation and characterization of Vibrio parahaemolyticus from Cape Cod soft-shell clams (Mya arenaria).- Appl. Microbiol., 29 (5) : 635 - 640.
- ELENA (M.), RECASENS (G.), PERAL LOPEZ (A.N.) et RUIZ REYES (G.), 1974.- Aislamiento de Vibrio parahaemolyticus en casos de gastro-enteritis y en mariscos crudos en la ciudad de Puebla.- Rev. latino-amer. Microbiol., 16 (2) : 85 - 88.
- FISHBEIN (M.) et WENTZ (B.), 1973 .- Vibrio parahaemolyticus, methodology for isolation from seafoods and epidemic specimens .- J. Milk Food Technol., 36 : 118-123
- FISHBEIN (M.), MEHLMAN (I.J.) et PITCHER (J.), 1970.- Isolation of Vibrio parahaemolyticus from the processed meat of Chesapeake Bay blue crabs.- Appl. Microbiol., 20 (2) : 176 - 178.
- FUJINO (T.), SAKAZAKI (R.) et TAMURA (K.), 1974.- Designation of the type strain of Vibrio parahaemolyticus and description of 200 strains of the species.- Int. J. Syst. Bacteriol., 24 (4) : 447 - 449.
- FUJINO (T.), OKUNO (Y.), NAKADA (D.), FUKAI (K.), MUKAI (T.) et UEHO (T.), 1953.- On the bacteriological examination of shirasu-food poisoning Med. J. of Osaka Univ., 4 (2 - 3) : 299 - 304.
- GIAMMANCO (G.), BENINATI (S.), GIAMMANCO (A.) et BRANCATO (P.), 1973.- Isolamento di vibrioni alofili riferibili a Vibrio parahaemolyticus e V. alginolyticus da pesci eda campioni d'acqua del Mediterraneo.- Bull. Ist. sieroterap. Milan., 52 (1) : 1 - 4.
- HALL (H.F.) et LEWIS (K.H.), 1967.- Clostridium perfringens and other bacterial species as possible causes of food borne disease outbreak of undetermined etiology.- Health Lab. Sci., 4 (4) : 229 - 235.

- HOOPER (W.L.), BARROW (G.I.) et Mc NAB (D.J.N.), 1974 .- Vibrio parahaemolyticus food poisoning in Britain .- Lancet, 7866 ; 1100-1102
- HORIE (S.), SAHEKI (K.) et OKUZUMI (M.), 1967.- Numération quantitative des Vibrio parahaemolyticus dans les eaux de mer et d'estuaires.- Bull. jap. Soc. sci. Fish., 33 (2) : 126 - 130.
- HORIE (S.), SAHEKI (K.), KOZIMA (T.) et SEKINE (Y.), 1963.- Oceanographic survey on the distribution of Takikawa's so-called pathogenic halophilic bacteria.- Bull. jap. Soc. sci. Fish., 29 (1) : 37 - 43.
- HORIE (S.), SAHEKI (K.), KOZIMA (T.), NARA (M.) et SEKINE (Y.), 1964.- Distribution of Vibrio parahaemolyticus in plancton and fish in the open sea.- Bull. jap. Soc. sci. Fish., 30 (9) : 786 - 791.
- JOHNSON (W.G.jr.), SALINGER (A.L.) et KING (W.C.), 1973.- Survival of Vibrio parahaemolyticus in oyster shellstock at two different storage temperatures.- Appl. Microbiol., 26 (1) : 122 - 123.
- KAMPELMACHER (E.H.), MOSSELL (D.A.A.), VAN NOORLE JANSSEN (L.M.) et VINCENTIE (H.), 1970.- A survey on the occurrence of Vibrio parahaemolyticus on fish and shellfish marketed in the Netherlands.- J. Hyg., 68 (2) : 189 - 196.
- KAMPELMACHER (E.H.), VAN NOORLE JANSSEN (L.M.), MOSSELL (D.A.A.) et GROEN (J.F.), 1972.- Survey on the occurrence of Vibrio parahaemolyticus and V. alginolyticus on mussels and oysters and in estuarine waters in the Netherlands.- J. Appl. Bacteriol., 35 (3) : 431 - 438.
- KANEKO (T.) et COLWELL (R.R.), 1973 .- Ecology of Vibrio parahaemolyticus in Chesapeake Bay .- J. Bacteriol., 113 (1) : 24-32
- KANEKO (T.) et COLWELL (R.R.), 1974.- Distribution of Vibrio parahaemolyticus and related organisms in the Atlantic Ocean off South Carolina and Georgia.- Appl. Microbiol., 28 (6) : 1009 - 1017.

- KANEKO (T.) et COLWELL (R.R.), 1975a).- Adsorption of Vibrio parahaemolyticus onto chitin and copepods .- Appl. Microbiol., 29 (2) : 269-274
- KANEKO (T.) et COLWELL (R.R.), 1975b .- Incidence of Vibrio parahaemolyticus in Chesapeake Bay .- Appl. Microbiol., 30 (2):251-257
- KOBAYASHI (T.), ENOMOTO (S.), SAKAZAKI (R.) et KUWAHARA (S.), 1963.- Un nouveau milieu d'isolement sélectif pour le groupe Vibrio (modification du milieu de NAKANISHI, gélose T.C.B.S.)- Jap. J. Bacteriol. 18 (10 - 11) : 387 - 392.(en japonais).
- KOBURGER (J.A.) et LAZARUS (C.R.), 1974.- Isolation of Vibrio parahaemolyticus from Salt Springs in Florida.- Appl. Microbiol., 27 (2) : 435-436.
- KOURANY (M.), KINNEY (R.J.) et VASQUEZ (M.A.), 1974.- Vibrio parahaemolyticus in sea water off the Pacific coast of Panama.- Amer. J. trop. Med. Hyg., 23 (4) : 714 - 715.
- KRANTZ (G.E.), COLWELL (R.R.) et LOVELACE (E.), 1969.- Vibrio parahaemolyticus from the blue crab (Callinectes sapidus) in Chesapeake Bay.- Science, 164, n° 3885 : 1286 - 1287.
- LEISTNER (L.) et HECHELMANN (H.), 1974.- Vorkommen und Bedeutung von Vibrio parahaemolyticus in Europa.- Fleisch. Wirtsch., 54 (11) 1819 - 1821.
- LIBINSON (A.E.), DOMARADSKIJ (I.V.), US (Z.I.), DEMINA (A.I.), NAGORNAYA (A.F.), SUKHOVA (G.M.) et KRIVTSOVA (R.B.), 1974.- Vibrions parahaemolytiques et germes halophiles voisins dans la Mer Noire.- Zbl. Mikrobiol., Epidemiol., Immunobiol., 5 : 80 - 84 (en russe).
- MATCHES (J.R.), LISTON (J.) et DANEALT (L.P.), 1971.- Survival of Vibrio parahaemolyticus in fish homogenate during storage at low temperatures.- Appl. Microbiol., 21 (5) : 951 - 952.
- MIYAMOTO (Y.), NAKAMURA (K.) et TAKIZAWA (K.), 1961.- Pathogenic halophiles proposal of a new genus "Oceanomonas" and of the amended species name.- Jap. J. Microbiol., 5 : 477 - 486.

- MIYAMOTO (Y.), KATO (T.), OBARA (Y.), AKIYAMA (S.), TAKIZAWA (K.) et YAMAI (S.)
1969.- In vitro hemolytic characterization of Vibrio parahaemolyticus:
its close correlation with human pathogenicity.- J. Bacteriol.,
100 (2) : 1147 - 1149.
- MOLENDIA (J.R.), JOHNSON (W.G.), FISHBEIN (M.), WENTZ (B.), MEHLMAN (I.J.)
et DADISMAN (T.A. jr.), 1972.- Vibrio parahaemolyticus gastro-
enteritis in Maryland : laboratory aspects.- Appl. Microbiol.,
24 (3) : 444 - 448.
- MUIC (V.), ZEKIC (R.), MARETIC (Z.), TELISMAN (Z.) et PRESECKI (V.), 1974.-
Isolement et identification de Vibrio parahaemolyticus, un
entéropathogène de sources marines du Nord de l'Adriatique, en
Croatie et Yougoslavie .- Lij. Vjes., 96 (2) : 101 - 105. (en
serbo-croate).
- NAKANISHI (H.), LEISTNER (L.) et BAUMGART (J.), 1967 .- Mise en évidence de
Vibrio parahaemolyticus et de Vibrio alginolyticus dans les poissons
de mer en Allemagne. Publication préliminaire .- Arch. lebensmittel-
hygiene, 18 (9) : 201-202 (en allemand)
- NAKANISHI (H.), LEISTNER (L.), HECHELMANN (H.) et BAUMGART (J.), 1968.-
Nouvelles études sur la présence de Vibrio parahaemolyticus et
V. alginolyticus dans les poissons de mer en Allemagne.- Arch.
Lebensmittel- Hyg., 19 (3) : 49 - 53. (en allemand).
- NEUMANN (D.A.), BENNENSON (M.W.), HUBSTER (E.), NGUYEN THI, NHU TUAN et
LE TIEN VAN, 1972.- Vibrio parahaemolyticus in the Republic of
Vietnam.- Amer. J. trop. Med. Hyg., 21 (4) : 464 - 466.
- PAPA (F.), 1980 .- Recherche et signification de Vibrio parahaemolyticus dans
les eaux côtières de la Guadeloupe .- Bull. Soc. Pathol. Exot., 73
(4) : 380-383
- PEFFERS (A.S.R.), BAILEY (J.), BARROW (G.L.) et HOBBS (B.C.), 1973.-
Vibrio parahaemolyticus gastroenteritis and international air
travel.- Lancet, 7795 : 143 - 145

- PELOUX (Y.), DESIDERI (D.) et PONS (J.L.), 1981 .- La toxi-infection alimentaire à Vibrio parahaemolyticus .- Nouv. Presse méd., 10 : 3074-3075
- PERNA (A.), 1970.- Prima segnalazione della presenza in Italia del Vibrio parahaemolyticus in Mytilus gallo-provincialis.- Veter. ital., 21 (78) : 479 - 484.
- PISANU (S.) et COSSEDDU (A.M.), 1971.- Rilievi sulla carica batterica totale e sul contenuto in coli, salmonelle e Vibrio parahaemolyticus in mitili (Mytilus gallo-provincialis, Lmk.) immessi al consumo a Sassari.- Atti. Soc. ital. Sci. veter., 25 : 410 - 412.
- RAY (B.), HAWKINS (S.M.) et HACKNEY (C.R.), 1978 .- Method for the detection of injured Vibrio parahaemolyticus in seafoods .- Appl. Environ. Microbiol., 35 (6) : 1121-1127
- RICHARD (C.), DENIS (F.) et PAPA (F.), 1981 .- Vibrio parahaemolyticus, souches humaines et de l'environnement marin. Bilan de 113 souches .- Bull. Assoc. Anc. Elèves Inst. Pasteur, 3è trim., 16-21
- RICHARD (C.), GIAMMANCO (G.) et POPOFF (M.), 1974.- Vibrio parahaemolyticus: isolement et diagnostic bactériologique.- Ann. Biol. Clin., 32 (1) : 33 - 40.
- RODRIGUEZ - REBOLLO (M.), TAMURA (K.), HECHELMANN (H.) et LEISTNER (L.), 1971.- Aislamiento del Vibrio parahaemolyticus en España.- Microbiol. esp., 24 (3) : 171 - 175.
- ROLAND (F.P.), 1970.- Leg-gangrene and endotoxin shock due to Vibrio parahaemolyticus : an infection acquired in New England coastal waters.- New England. J. med., 282 (23) : 1306.
- ROLAND (F.P.), 1971.- Vibrio parahaemolyticus : a case report .- Clin. Med., 78 (8) : 26 - 27 et 31 - 33.
- SAKAZAKI (R.), 1963.- Proposal of Vibrio alginolyticus for the biotype 2 of Vibrio parahaemolyticus.- Jap. J. Med. Sci. Biol., 21 (5) : 359 - 362.

- SAKAZAKI (R.), IWANAMI (S.) et FUKUMI (H.), 1963.- Studies on the enteropathogenic, facultatively halophilic bacteria, Vibrio parahaemolyticus. I. Morphological, cultural, and biochemical properties and its taxonomic position.- Jap. J. Med. Sci. Biol., 16 : 161 - 188.
- SAKAZAKI (R.), TAMURA (K.), KATO (T.), OBARA (Y.), YAMAI (S.) et HOBO (K.), 1968.-Studies on the enteropathogenic, facultatively halophilic bacteria, Vibrio parahaemolyticus. III. Enteropathogenicity.- Jap. J. Med. Sci. Biol., 21 (5) : 325 - 331.
- SANYAL (S.C.), SIL (J.) et SAKAZAKI (R.), 1973.- Laboratory infection by Vibrio parahaemolyticus.- J. Med. Microbiol., 6 (1) : 121 - 122.
- SARKAR (B.L.), NAIR (G.B.), SIRCAR (B.K.) et PAL (S.C.), 1983 .- Incidence and level of Vibrio parahaemolyticus associated with fresh water plankton .- Appl. Environ. Microbiol., 46 (1) : 288-290
- SAYLER (G.S.), NELSON (J.D.jr), JUSTICE (A.) et COLWELL (R.R.), 1976 .- Incidence of Salmonella spp., Clostridium botulinum and Vibrio parahaemolyticus in an estuary .- Appl. Environ. Microbiol., 31 (5) : 723-730
- SMITH (M.R.), 1971.- Vibrio parahaemolyticus.- Clin. Med., 78 (2) : 22 et 24 - 25.
- TAKIKAWA (I.), 1968.- Studies on halophilic bacteria.- Yokohama Med. Bull., 9 : 313 - 322.
- THOMPSON (W.K.) et TRENHOLM (D.A.), 1971.- The isolation of Vibrio parahaemolyticus and related halophilic bacteria from Canadian Atlantic shellfish.- Canad. J. Microbiol., 17 (4) : 545 - 549.
- TUBLASH (H.S.), CHANLEY (P.E.) et LEIFSON (E.), 1965.- Bacillary necrosis, a disease of larval and juvenile bivalve mollusks. I. Etiology and epizootiology.- J. Bacteriol., 90 (4) : 1036 - 1044.
- TWEDT (R.M.) et BROWN (D.F.), 1973.- Vibrio parahaemolyticus:infection or toxicosis ? .- J. Milk Food Technol., 36 (3) : 129 - 134.

- TWEDT (R.M.) et NOVELLI (R.M.), 1971.- Modified selective and differential isolation medium for Vibrio parahaemolyticus.- Appl. Microbiol., 22 (4) : 593 - 599.
- TWEDT (R.), SPAULDING (R.) et HALL (H.), 1969.- Morphological, cultural, biochemical, and serological comparison of japanese strains of Vibrio parahaemolyticus with related cultures isolated in the United States.- J. Bacteriol., 98 (2) : 511 - 518.
- VANDERZANT (C.) et NICKELSON (R.), 1973.- Vibrio parahaemolyticus : a problem in mariculture ? .- J. Milk Fd. Technol., 46 (3) : 135 - 139.
- VANDERZANT (C.) et THOMPSON (C.A.jr.), 1973.- Microbial flora and level of Vibrio parahaemolyticus of oysters (Crassostrea virginica), water and sediment from Galveston Bay.- J. Milk Fd. Technol., 36 (9) : 447 - 452.
- VANDERZANT (C.), NICKELSON (R.) et PARKER (J.C.), 1970.- Isolation of Vibrio parahaemolyticus from Gulf Coast shrimp.- J. Milk Fd. Technol., 33 (4) : 161 - 162.
- VARGA (S.) et HIRTLE (W.A.), 1975.- Incidence of Vibrio parahaemolyticus in fish, shellfish, mud, water, and fish products in the Canadian Maritime Region.- J. Fish. Res. Bd. Canada, 32 (4) : 541 - 544.
- VASCONCELOS (G.J.), STANG (W.J.) et LAIDLAW (R.H.), 1975.- Isolation of Vibrio parahaemolyticus and V. alginolyticus from estuarine areas of south-eastern Alaska.- Appl. Microbiol., 29 (4) : 557 - 559.
- WARD (B.Q.), 1968 .- Isolations of organisms related to Vibrio parahaemolyticus from american estuarine sediments .- Appl. Microbiol., 16 (3) : 543-546
- ZALESKI (S.), DACZKOWSKA (E.), FIK (A.), DZIDO (E.) et GRACZ (J.), 1975 .- Vorkommen des Vibrio parahaemolyticus bei fischen aus der Südlichen Zentral-Ostsee im Vergleich mit anderen Ergebnissen in Europa .- Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B 161 : 288-294

II. VIBRIONS NON HALOPHILES

En 1972, lorsqu'une nouvelle pandémie de choléra se déclare en Extrême-Orient et s'étend en Afrique, le Service des Contrôles de l'I.S.T.P.M. demande à notre laboratoire d'effectuer la recherche et l'identification des vibrions cholériques dans plusieurs espèces de coquillages comestibles. Ces derniers proviennent, soit de nos élevages, soit de l'importation : moules (Mytilus edulis et M. galloprovincialis), palourdes (Tapes decussatus) et coques (Cardium edule). Ensuite, la presse se fait l'écho, en septembre 1974, d'un cas de choléra à Marseille. Mais il se révèle que celui-ci trouve son origine sur place. La littérature signale la présence du germe à nos portes : DE LORENZO et al. (1973) et BAYNE et al. (1974) en Italie; FURNISS et DONOVAN (1974) en Angleterre l'identifient à partir de selles de personnes de retour des pays où la maladie existe.

A - LES AGENTS PATHOGENES. REPARTITION

L'agent classique, historique, du choléra est le bacille décrit en 1883 par R. KOCH, à gram négatif, non sporulé, incurvé, isolé ou en chaînettes, très mobile et très aérophile. Il cultive très rapidement dans les bouillons peptonés alcalins, peu ou pas salés où il forme de l'indole en quelques heures. L'adjonction de quelques gouttes d'acide sulfurique à la culture fait apparaître une coloration rouge violacée. La réaction du choléra-roth est positive. Il attaque le glucose et le lactose de la gélose de Kligler sans production de gaz ni d' H_2S .

Actuellement, le vibron du choléra semble être le Vibrio cholerae biotype El Tor qui se différencie du précédent par un certain nombre de caractères, dont la formation d'acétoïne.

Leur répartition est mondiale. Ils vivent de préférence dans les eaux douces, mais ils peuvent survivre une semaine dans l'eau de mer naturelle (CHEVALIER et VANDEKERKOVE, 1980).

Des V. cholerae sont isolés par COLWELL et al. (1977) de la baie de Chesapeake avec un nombre probable de 3,3/1000. La température joue un rôle critique pour leur recouvrement, mais leur association avec les mollusques et les crustacés ne doit pas être considérée comme dramatique. Les auteurs ne notent pas de corrélation avec les coliformes fécaux.

B - MATERIEL ET METHODE

Les techniques de broyage et de culture, ainsi que certains milieux utilisés sont voisins de ceux employés antérieurement. La composition du bouillon d'enrichissement, légèrement différente, est donnée en annexe.

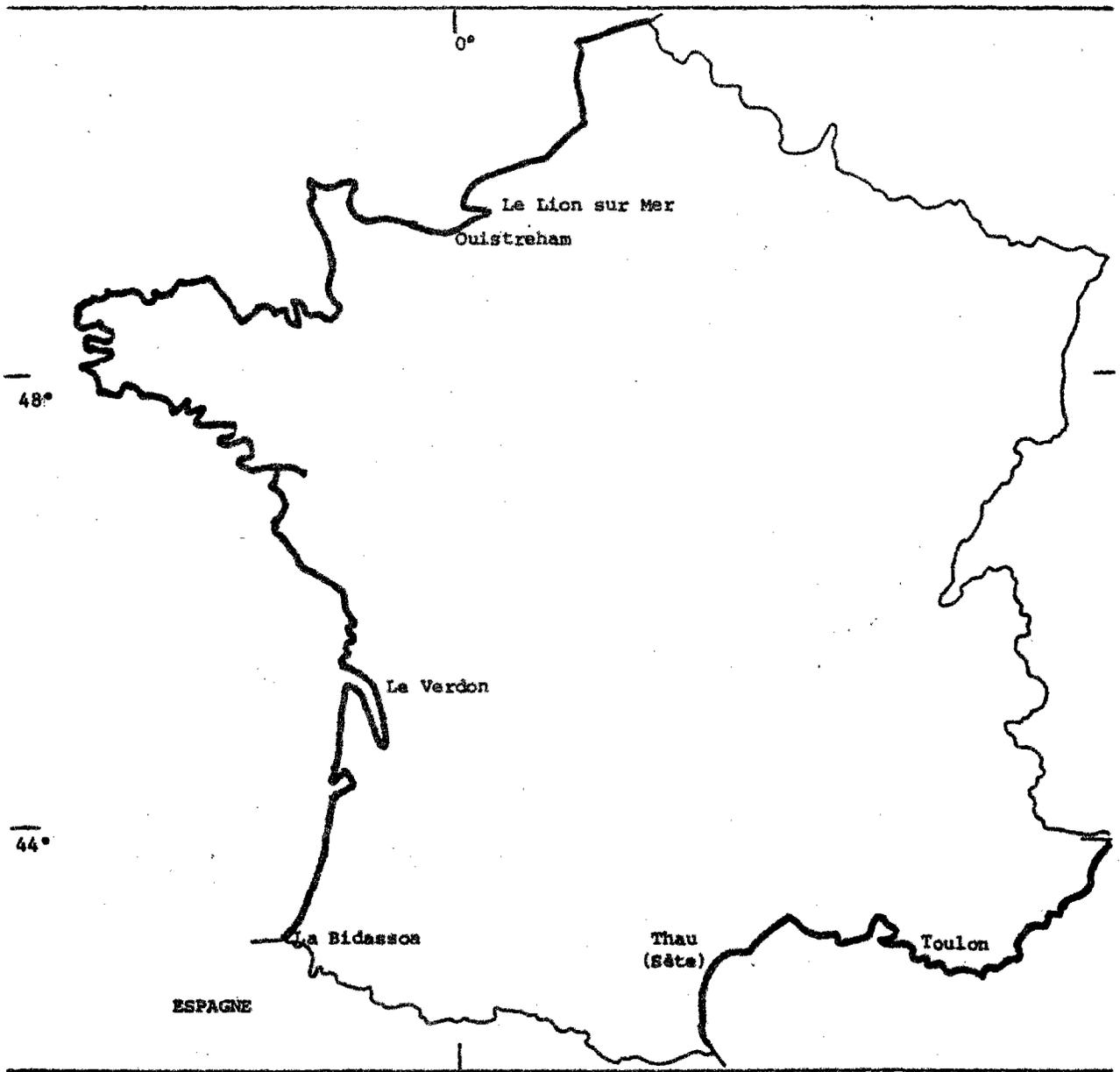


Figure 2

Date	Produit	Origine
1973 septembre	moules moules moules moules	Espagne Toulon parc Toulon épuration Sète
1974 juillet	moules moules moules palourdes moules moules coques moules	Espagne La Bidassoa ¹ Le Verdon Thau ¹ Thau Ouisseham ¹ Ouisseham Lion sur Mer

Tabl. 4 - Vibrions non halophiles des coquillages comestibles : pour tous les échantillons il y a absence de vibrions O1, et présence de vibrions non O1 (V.N.C.)(1 : zone insalubre)

C - RESULTATS ET DISCUSSION

Sur gélose nutritive et sous un éclairage oblique les colonies des vibrions cholériques apparaissent verdâtres à rouge brique à structure finement granulaire (FEELEY, 1962). De plus, elles sont gélatinolytiques, ce qui peut aider à les reconnaître (FINKELSTEIN et GOMEZ, 1963).

Aucun des coquillages soumis à notre analyse ne renferme de vibrions qui, tout en possédant les caractères biochimiques nécessaires pour être identifiés à l'espèce Vibrio cholerae, ne s'immobilisent pas en masses en présence de l'anti-sérum O sous groupe 1 de GARDNER et VENKATRAMAN (1935). Ce sont donc des vibrions non cholériques (V.N.C.) ou des vibrions non agglutinables (N.A.G.) ou des Vibrio cholerae non O1, selon les dénominations habituellement employées pour les désigner. Or dans une étude du complexe antigénique O des vibrions N.A.G., GALLUT (1963) avait démontré qu'ils se répartissaient en groupes si l'on utilisait des sérums anti-O préparés par injection aux lapins de cellules préalablement chauffées à 100°C pendant 2 heures. Si ces vibrions sont agglutinables il faut reconnaître la diversité extrême de leurs antigènes somatiques puisque l'auteur dénombre 24 types pour 47 souches étudiées.

Au moins une souche de vibrion non cholérique a été reconnue comme pouvant produire une entérotoxine semblable à celle du choléra (CRAIG et al. 1981).

Selon PANIKER et NAIR (1967), dans une étude sur la résistance des vibrions pathogènes aux antibiotiques, ce sont les vibrions non agglomérant en sérum O1 qui sont les plus résistants. Le vibrion cholérique classique est le plus sensible. Le vibrion El Tor est le plus adapté à la survie dans les milieux extérieurs selon GOL'D et al. (1973). Ceci expliquerait que la pandémie des années 70 lui soit imputée.

DUTT et al. (1971) rapportent une épidémie de choléra en Malaisie due à la consommation de crustacés et de coquillages crus ou partiellement cuits. Dans l'eau, les aliments et les selles des patients ils isolent des Vibrio El Tor et, comme cela est le cas dans cette étude, des V.N.C.

La flore normale des fèces ne comporte pas de vibrions. Il arrive que dans certains épisodes diarrhéiques, les Vibrio parahaemolyticus voisinent avec des V.N.C. Dans 18 cas sur 37, CHATTERJEE et al. (1970) mettent en évidence de 10^6 à 10^8 U.F.C. de vibrions/ml de selles chez des malades hospitalisés à Calcutta en 1968. Les souches étudiées ne sont pas cholériques. D'après leurs réactions biochimiques, elles se répartissent en deux grands groupes. D'une part, les V. parahaemolyticus halophiles, saccharose négatif (objets de notre travail antérieur), non responsables de gastro-entérites dans notre pays. D'autre part, des vibrions non halophiles qui se divisent eux-mêmes en saccharose positif et saccharose négatif. La présence de ces germes inhabituels et la diminution concomitante de la flore habituellement présente dans les selles permettent d'impliquer un rôle pathogène aux micro-organismes non halophiles. Il faut rappeler à cette occasion que, dans leur étude de 1967, SAKAZAKI et al. avaient différencié deux biotypes parmi les vibrions N.A.G. après avoir étudié la physiologie et la biochimie de 142 souches. Il

ne semble pas que sous nos latitudes ces vibrions non cholériques, présents en grand nombre dans les coquillages, trouvent dans le tube digestif des consommateurs un milieu favorable au déclenchement de troubles intestinaux.

Parmi les auteurs qui se sont attachés à étudier et à mettre l'accent sur le rôle pathologique des V.N.C., il faut citer : DE et al. (1966), RANJIT SEN (1970) qui cite une abondante littérature, KAMAL (1971), EL GHOROURY (1971) et YUTAKA ZINNAKA (1971). Dans tous les cas observés, le syndrome est voisin de celui du choléra. L'émission de liquide est moindre. La réhydratation joue un rôle important dans la guérison. L'épisode concernant le patient est moins long que dans le cas d'un choléra vrai et l'épidémie est limitée.

RANJIT SEN (1970) compare 187 souches de vibrions agglutinables (119 de fèces humaines et 68 d'eau) et 150 souches de vibrions non agglutinables (108 et 42 respectivement) à deux souches de référence, V. cholerae et V. cholerae biotype El Tor. 41 tests morphologiques et physiologiques sont identiques à 100 %. Parmi les 18 autres caractères, plus de 80 % des souches agglutinables et non agglutinables ont des réponses identiques à celles des souches de référence. Il est normal que des organismes aussi voisins soient à l'origine de symptômes presque identiques. Il faut donc accorder beaucoup d'intérêt aux vibrions, même s'ils n'agglutinent pas en sérum O1. Les souches que nous isolons auraient pu être à l'origine de dérèglements intestinaux avec fuite cationique.

VANDEPITTE (1972), qui considère les vibrions N.A.G. comme des saprophytes aquatiques dont certains types peuvent coloniser l'intestin humain, parfois avec un effet entéropathogène, pense que ceux-ci doivent exister en Europe.

Les syndromes cholériques, ou pseudo-cholériques, peuvent être imputables à d'autres Vibrio ou à des micro-organismes de genres différents, parfois éloignés (Enterobacteriaceae). DEKEYSER et al. (1972) isolent pour la première fois un Vibrio fetus dans une atmosphère artificielle, à partir de fèces de patients victimes d'entérite aiguë. SACK et al. cités par VANDEPITTE (1972), après un suivi minutieux de malades souffrant de pseudo-choléra à Calcutta pendant la saison favorable au développement de la maladie en 1968, mettent en évidence des colibacilles entérotoxiques appartenant à des sérotypes qui n'avaient jamais été considérés comme entéropathogènes auparavant ; d'autres étaient non typables.

Si cette étude se révèle négative quant à la présence des vibrions cholériques, classiques ou El Tor, ce dont il y a lieu de se réjouir, elle sert à mettre en évidence le rôle peu connu jusqu'alors, joué par des germes voisins, apparentés ou éloignés dans les manifestations de diarrhées estivales.

Mots clefs : Vibrio cholerae, Vibrio cholerae biotype El Tor, dénombrement, milieux, techniques de culture, coquillages comestibles, moules, palourdes, coques

REMERCIEMENTS

Nous souhaitons que M. le Professeur DODIN de l'Institut Pasteur de Paris et M. LECLERC, Directeur de l'INSERM (U 146) à Villeneuve d'Ascq, trouvent ici l'expression de notre gratitude pour la vérification de nos identifications et la lecture de notre texte.

Nous sommes reconnaissant envers M. le Professeur BIANCHI de l'Université de Provence à Marseille pour ses remarques sur la rédaction de ce compte rendu d'analyse.

Les recherches en laboratoire étant suspendues depuis plus de 10 ans, notre propos reste davantage une relation des résultats obtenus qu'une recherche bibliographique exhaustive pour la période 1975-1983.

Annexe

Bouillon d'enrichissement selon GENEVRAY et BRUNEAU en g/l.

Peptone sans indole	20
Extrait de levure	2
NaCl	30

Ajuster le pH à 8,0 avec NaOH.

Autoclaver à 115°C pendant 20 mn.

Ensemencer selon la technique du nombre le plus probable (N.P.P.) :
3 tubes avec 1 ml de broyat, puis 1 ml de chacune des dilutions décimales successives jusqu'à 10^{-6} .

Incuber à 37°C pendant 3 h.

Repiquer 1 anse dans un autre tube de même milieu. Rechercher la présence de l'indole dans le tube incubé. Une réaction positive (coloration rouge avec le réactif nitrique nitreux) indique la présence des V. cholerae.

Isoler sur gélose T.C.B.S. non enrichie en NaCl.

Résumé

Pour l'information du service des Contrôles, qui n'en effectuait pas la recherche systématique, il a été demandé à notre laboratoire de mettre en évidence la présence des vibrions non halophiles. Ces isolements effectués n'ont pas abouti à l'identification de Vibrio cholerae, non plus qu'à celle de son biotype El Tor. Les bactéries isolées sont non agglutinables. Bien que pouvant avoir une action pathogène sur l'homme, aucune diarrhée suspecte n'a été signalée à cette époque.

Summary

Ten years ago the "Service des Contrôles" didn't carry out the systematical research of non halophilic vibrios. For its information our laboratory was requested about their possible presence in a variety of edible shells. The identified bacteria were only N.A.G. ones. Although their possible pathological action on men not any suspicious diarrhea was pointed out at that time.

Bibliographie

- BAINÉ (W.B.), ZAMPIERI (A.), MAZZOTTI (M.), ANGIONI (G.), GRECO (D.), GIOIA (M.D.), IZZO (E.) et GANGAROSA (E.J.), 1974 .- Epidemiology of cholera in Italie .- Lancet, 7833 : 1370-1375
- CHATTERJEE (B.D.), GORBACH (S.L.) et NEOGY (K.N.), 1970.- Vibrio parahæmolyticus and diarrhoea associated with non-cholera vibrios.- Bull. Organ. mond. Santé, 42 (3) : 460 - 463,
- CHEVALIER (M.) et VANDEKERKOVE (M.), 1980 .- Etude expérimentale de la survie de Vibrio cholerae biotype El Tor dans le milieu marin .- Bull. Soc. Pathol. Exot., 73 (4) : 364-372
- COLWELL (R.R.), KAPER (J.) et JOSEPH (W.), 1977 .- Vibrio cholerae, Vibrio parahæmolyticus and other vibrios : occurrence and distribution in Chesapeake Bay .- Science, 138 (4315) : 334-336.
- CRAIG (J.P.), YAMAMOTO (K.), TAKEDA (Y.) et MIWATANI (T.), 1981 .- Production of cholera-like enterotoxin by a Vibrio cholerae non-O1 strain isolated from the environment .- Infect. Immun., 34 (1) : 90-97
- DE (S.P.), RENUCKA SINHA et DEB (B.C.), 1966.- Studies on choleraic diarrhoea in Calcutta.- Ind. J. Med. Res., 54 (11) : 1011 - 1016.
- DEKEYSER (P.), GOSSUIN-DETRAIN (M.), BUTZLER (J.P.) et STERNON (J.), 1972.- Acute enteritis due to related Vibrio : first positive stool culture J. infect. Dis., 125 (4) : 390 - 392.
- DE LORENZO (F.), SOSCIA (M.), ARCIELLO (G.), SCHISA (C.) et BUOGO (A.), 1973.- Sul reperto di "Vibrio cholerae" nelle acque fognarie della città di Napoli durante il recente episodio epidemico di colera.- Riv. ital. Ig., 33 (1 - 3) : 29 - 39.
- DUTT (A.K.), SYED ALWI et VELAUTHAN (T.), 1971.- A shellfish-borne cholera outbreak in Malaysia.- Trans. r. Soc. trop. Med. Hyg., 65 (6) : 815 - 818.

- EL GHOROURY (A.A.A.), 1971.- Search for non-cholera vibrios in surface waters. diarrhoeal and normal stools in and around Alexandria, U.A.R.- J. egypt. public Health Assoc., 46 (3) : 175 - 180.
- FEELEY (J.C.), 1962 .- Isolation of cholera vibrios by positive recognition plating procedures .- J. Bacteriol., 84 (4) : 866-867
- FINKELSTEIN (R.A.) et GOMEZ (C.Z.), 1963 .- Comparison of methods for the rapid recognition of cholera vibrios .- Bull. Org. Mond. Santé, 28 (3) : 327-332
- FURNISS (A.L.) et DONOVAN (T.J.), 1974.- The isolation and identification of Vibrio cholerae.- J. clin. Pathol., 27 (9) : 764 - 766.
- GALLUT (J.), 1963 .- Contribution à l'étude du complexe antigénique "O" des vibrions. III. Recherche sur les agglutinogènes thermostables des vibrions NAG .- Ann. Inst. Pasteur, 105 (6) : 1080-1097
- GOL'D (E.Y.), MARCHUK (L.M.) et MOGLEVSKIJ (L.Y.), 1973.- A propos de la genèse du choléra El Tor.- Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol., 3 : 122 - 127. (en russe).
- KAMAL (A.M.), 1971.- Outbreak of gastroenteritis by non-agglutinable (NAG) vibrios in the Republic of the Sudan.- J. egypt. public Health Assoc., 46 (3) : 125 - 159.
- PANIKER (C.K.J.) et NAIR (C.M.G.), 1967.- Drug sensitivity of vibrios.- Indian J. Med. Res., 55 (3) : 215 - 218.
- RANJIT SEN, 1970.- A comparison of strains of so-called NAG vibrios with those of strains of Vibrio cholerae.- Indian J. Med. Res., 58 (11) : 1528 - 1535.
- SAKAZAKI (R.), GOMEZ (C.Z.) et SEBALD (M.), 1967.- Taxonomical studies of the so -called NAG vibrios.- Jap. J. med. Sci. Biol., 20 (4) : 265 - 280.

VANDEPITTE (J.), 1972.- Vibrions non-cholériques et syndromes pseudocholériques.- Acta Gastro-Enterologica Belgica, 35 (7 - 8) : 333 - 340.

YUTAKA ZINNAKA, 1971.- Characterization of vibrios isolated from the cases of cholera-like diarrhoeal disease in the Sudan.- J. egypt. public Health Assoc., 46 (3) : 161 - 174.

III. ADDENDUM

A. NORMES JAPONNAISES

En 1974, SAKAZAKI et al., considérant que Vibrio parahaemolyticus a été reconnu comme un micro-organisme entéropathogène susceptible de se trouver partout dans le milieu marin littoral et pré-littoral, créent un comité de travail sous l'égide du Ministère de la Santé et du Bien Etre du Japon pour établir les normes hygiéniques applicables aux produits alimentaires d'origine halieutique. Les résultats de leurs travaux sont publiés en 1979.

Les aliments les plus habituels (chinchards, thons, calmars et poulpes) ont été examinés par tous les membres du comité, tandis que les poissons plats, labres, sargues, sérioles, brêmes, crevettes, clams, coques et ascidies, dont la consommation est moins courante, ont été laissés au choix des différents laboratoires. Le matériel de cuisine a aussi été soumis à l'enquête.

Les dénombrements de cellules viables ont été effectués par la méthode du nombre le plus probable entre juillet et septembre 1976. A partir d'un échantillon de 10 g dilué au 1/10 dans un bouillon salé à la polymyxine les auteurs effectuent des dilutions décimales successives jusqu'à 10^{-5} . Pour chacune, 3 tubes d'enrichissement sont incubés à 35° C pendant 24 heures. Une anse de culture de chaque tube est étalée sur une gélose TCBS. La quantité de germes pour 100 g d'échantillon est calculée à partir des dilutions qui sont à l'origine de la croissance de colonies caractéristiques de V. parahaemolyticus apparues à 35° C après 24 heures. Une étude préliminaire avait en effet démontré que, par cette association de bouillon d'enrichissement et de gélose d'isolement, 99 % des colonies bleu-vertes avaient pu être identifiées à V. parahaemolyticus et que la nécessité d'une identification biochimique n'était plus utile.

Les auteurs considèrent que dans le poisson entier et dans la chair, il devrait y avoir $< 10^4$ CFU/100 g et sur le matériel < 10 CFU/boîte de 5 cm de diamètre après application. Dans les coquillages ils notent la présence de $> 10^5$ CFU/100 g et dans les crevettes $< 10^2$ CFU/100 g.

B. AUTRES VIBRIONS PATHOGENES

Jusqu'à la fin de nos recherches, le nombre des vibrions pouvant avoir une action pathogène sur l'homme était limité à 3 : V. cholerae, biotypes cholerae et El Tor, V. parahaemolyticus et V. alginolyticus. En 1982, HICKMAN et al. en recensent 5 autres : V. vulnificus, V. fluvialis, V. damsela, V. metschnikovii et V. hollisae, en faisant abstraction de V. mimicus considéré comme un V. cholerae atypique par le sous-comité de la taxonomie des Vibrionaceae (Anon. 1984). Ce sont donc 8 vibrions identifiés qui peuvent être la cause de maladies humaines.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Anon., 1984 .- Int. j. syst. Bactériol., 34 (2) : 251-252

HICKMAN (F.W.), FARMER (J.J.III), HOLLIS (D.G.), FANNING (G.R.),
STEIGERWALT (A.G.), WEAVER (R.E.) et BRENNER (D.J.), 1982 .-
Identification of V. hollisae sp. nov. from patients with
diarrhea .- J. clin. Microbiol., 15 (3) : 395-401

SAKAZAKI (R.), KARASHIMADA (T.), YUDA (K.), SAKAI (S.), ASAKAWA (Y.)
YAMAZAKI (M.), NAKANISHI (H.), KOBAYASHI (K.), NISHIO (T.),
OKAZAKI (H.), DOKE (T.), SHIMADA (T.) et TAMURA (K.), 1979 .-
Enumeration of and hygienic standard of food safety for,
Vibrio parahaemolyticus .- Archiv. für Lebensmittelhygiene,
30 : 103-106