

## **Toxi-infections alimentaires collectives liées à la consommation de moules contaminées par *Vibrio parahaemolyticus* : Enquête environnementale**

Dominique Hervio-Heath<sup>1</sup>, Mohamed Zidane<sup>2</sup>, Jean Claude Le Saux<sup>1</sup>, Solen Lozach<sup>1</sup>, Véronique Vaillant<sup>3</sup>, Soizick Le Guyader<sup>1</sup> et Monique Pommepuy<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Laboratoire de Microbiologie, Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer, Plouzané et Nantes

<sup>2</sup> Laboratoire National de Référence pour la microbiologie des coquillages, Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer, Nantes

<sup>3</sup> Institut de Veille Sanitaire, Saint-Maurice

### **Mots Clés**

*Vibrio parahaemolyticus*, hémolysines thermostables TDH et TRH, TIAC, coquillages, environnement.

## **INTRODUCTION**

*Vibrio parahaemolyticus*, bactérie marine, a été mis en évidence lors de nombreuses toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) aux USA, Canada, Japon, et en Asie (1). Si peu de données existent en Europe (2, 3), sur l'incidence des infections à *V. parahaemolyticus*, le risque potentiel associé à la consommation de coquillages crus ou peu cuits doit cependant être pris en considération.

Onze foyers de TIAC (100 malades), liés à la consommation de moules en provenance de deux zones de production irlandaise, ont été déclarés en France les 10 et 11 juin 2001 (4). Les symptômes les plus fréquemment rapportés par les malades étaient des crampes et des douleurs abdominales (apparition sous 3 à 4 heures) suivies de vomissements et de diarrhée (12 heures). Les investigations des autorités sanitaires compétentes ont montré que les coquillages irlandais avaient été stockés sur estran dans la zone de production ou retrempés dans les bassins d'un établissement conchylicole situé dans le Finistère, avant conditionnement et commercialisation. Ces moules avaient ensuite été distribuées par différentes enseignes de supermarchés, plusieurs mareyeurs et grossistes et quelques restaurants. Les investigations, effectuées par l'AFSSA (Maisons-Alfort), sur les lots de moules impliqués, ont été dans un premier temps concentrées sur la recherche de phycotoxines diarrhéiques. En l'absence de ces toxines dans les coquillages, les investigations se sont orientées vers la recherche de virus entériques humains et de bactéries (salmonelles et vibrions) pouvant être également responsables de TIAC lors de la consommation de mollusques vivants. Les analyses ont mis en évidence la présence de trois souches de *V. parahaemolyticus* pathogènes (présence de l'hémolysine thermostable directe, TDH; confirmation par le Centre National de Référence des Vibrions et du Choléra, Institut Pasteur, Paris, entre les 3 et 12 juillet 2001). L'Institut de Veille Sanitaire et la Direction Générale de l'Alimentation (DGAI) ont aussitôt été contactés et informés, puis ont averti le Laboratoire de Microbiologie de l'Ifremer (16 juillet 2001).

Dans ce contexte, une étude environnementale a été initiée par Ifremer, afin d'estimer le risque d'implantation de souches *V. parahaemolyticus* pathogènes dans le site de production conchylicole où fut effectué le re-trempage des moules.

## **MATERIEL ET METHODES**

### **Prélèvements des échantillons naturels**

Des échantillons d'huîtres creuses (*Crassostrea gigas*) présentes sur le site au moment du re-trempage des moules irlandaises, ont été prélevés le 1er août 2001, soient 7 semaines après le début des TIAC, et analysés par culture sur milieu sélectif afin de rechercher cette bactérie. Des prélèvements d'eau et de sédiment situés à proximité de cette zone ont également été effectués.

Simultanément, des moules saines (préalablement analysées pour vérifier l'absence de ce vibron) en provenance d'un autre site d'élevage, ont été retrempées pendant 4 semaines dans le secteur concerné afin de contrôler l'éventuelle implantation de ce pathogène. Deux prélèvements de trente moules et d'un litre d'eau réalisés à J16 et J28 ont été analysés pour *V. parahaemolyticus*.

### **Analyses bactériologiques**

Une dizaine de colonies bactériennes, présomptives *V. parahaemolyticus*, et représentatives de l'ensemble des boîtes de culture a été sélectionnée pour chaque échantillon analysé. La caractérisation des souches a été réalisée par tests biochimiques et leur identification confirmée par la technique d'amplification génique (PCR) après extraction de l'ADN total (5). Les extraits d'acides nucléiques des souches confirmées *V. parahaemolyticus* avec les amorces VP32 et VP33 ont été testés en PCR avec les couples d'amorces L-tdh/R-tdh et L-trh/R-trh, amplifiant deux gènes d'hémolysine, *tdh* et *trh*, codant pour des facteurs de pathogénicité (5).

## **RESULTATS**

### **Analyses des échantillons naturels d'huîtres, de sédiment et d'eau de mer**

Vingt des 35 souches isolées des différents prélèvements (huîtres, sédiment, eau de mer), ont été confirmées *V. parahaemolyticus*. Cependant, aucune de ces 20 souches *V. parahaemolyticus* ne portait le gène *tdh*, codant pour l'hémolysine TDH (thermostable direct hemolysin), recherchée comme facteur de pathogénicité. Par contre, le gène *trh*, codant pour l'hémolysine TRH (TDH-related hemolysin), a été mis en évidence chez 6 de ces souches confirmées *V. parahaemolyticus*.

### **Cinétique de contamination**

Vingt et une des 62 souches isolées des moules sont confirmées *V. parahaemolyticus*, mais seule une de ces souches possédait le gène *trh*.

## **DISCUSSION - CONCLUSION**

Les résultats de cette étude indiquent qu'il n'y a pas eu d'accumulation du vibron recherché (*V. parahaemolyticus* - *tdh* positif) dans les coquillages. Il n'a pas non plus été mis en évidence dans les sédiments ou l'eau de mer. A priori, au cours de cette période estivale, ce vibron ne s'est pas implanté à proximité des établissements conchylicoles et dans la zone concernée par le re-trempage de moules irlandaises. Ce résultat est intéressant car *V. parahaemolyticus* étant une bactérie marine, son implantation dans l'écosystème et son éventuelle prolifération dans l'écosystème seraient envisageables. En particulier, lorsque les conditions le permettent, i.e., si un lot immergé très contaminé reste en place suffisamment longtemps dans des eaux marines à des températures supérieures à 18°C.

Le deuxième résultat important concerne la mise en évidence dans ce secteur de la présence de souches porteuses du gène codant pour l'hémolysine TRH, apparentée à l'hémolysine thermostable directe et également associée à des gastro-entérites causées par *V. parahaemolyticus* (6). Le pourcentage de présence de cette souche est plus élevé (5 à 30 %) que celui reporté lors d'études précédentes i.e., de l'ordre de 1 à 3 % pour les souches de l'environnement (7). Ce résultat est très important sur le plan sanitaire. En effet, comme ce *V. parahaemolyticus* (*trh* positif) a déjà été incriminé dans des pathologies, il serait intéressant de poursuivre les investigations. Peu d'information existe sur ce sujet et il serait intéressant de mieux connaître la pathogénicité de ce vibron, la répartition de cette espèce sur le littoral français, et de ce fait son implication potentielle dans des toxico-infections alimentaires. Rappelons qu'en 2001, la proportion de foyers de TIAC déclarés en France, pour lesquels l'étiologie était inconnue ou non confirmée, était supérieure à 51% (4).

Enfin, une collaboration étroite entre les différentes structures (AFSSA, INVS, DGS, DGAL, DPMA, CNR des Vibrions et du Choléra - Institut Pasteur, Ifremer, ...) a eu lieu lors de cet événement de TIAC. Cependant, cet épisode indique qu'une contamination potentielle par *Vibrio* devrait être prise en considération de manière plus systématique – en particulier durant la période estivale - compte tenu de l'évolution environnementale (réchauffement des eaux littorales) et des pratiques de transferts de mollusques issus des eaux françaises et de l'Union Européenne. Une recherche plus précoce de ce microorganisme aurait permis une gestion plus efficace des événements et un contrôle plus rapide du site de re-trempage des coquillages irlandais. Un effort dans ce sens serait nécessaire – l'objectif final étant d'assurer la sécurité alimentaire des consommateurs et un développement durable de la conchyliculture.

## REFERENCES

1. Daniels NA, MacKinnon L, Bishop R, Altekruise S, Ray B, Hammond RM, Thompson S, Wilson S, Bean NH, Griffin PM, Slutsker L. *Vibrio parahaemolyticus* infections in the United States, 1973-1998. *J Infect Dis* 2000; 181: 1661-1666.
2. Geneste G, Dab W, Cabanes PA, Vaillant V, Quilici ML, Fournier JM. Les vibrioses non cholériques en France : Cas identifiés de 1995 à 1998 par le centre national de référence. *BEH* 2000; 9: 38-40.
3. Martinez-Urtaza J, Lozano-Leon A, DePaola A, Ishibushi M, Shimada K, Nishibuchi M, Libiena E. 2004. Characterization of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* from clinical sources in Spain and comparison with Asian and North American pandemic isolates. *J. Clin. Microbiol.* (2004) ; 42 : 4672-4678.
4. Haeghebaert S, Le Querrec F, Bouvet P, Gallay A, Espié E, Vaillant V. Les toxi-infections alimentaires collectives en France en 2001. *BEH* 2002; 50: 249-253.
5. Hervio-Heath D, Colwell RR, Derrien A, Robert-Pillot A, Fournier JM, Pommepuy M. Occurrence of pathogenic vibrios in coastal areas of France. *J App Microbiol* 2002; 92: 1123-1135.
6. Shirai H, Ito H, Hirayama Y, Nakamoto T, Nakabayashi N, Kumagai K, Takeda Y, Nishibuchi M. Molecular epidemiologic evidence for association of thermostable direct hemolysin (TDH) and TDH-related hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* with gastroenteritis. *Infect Immun* 1990; 58: 3565-3573.
7. Wong HC, Shieh WR, Lee YS. Toxigenic characterization of vibrios isolated in foods available in Taiwan. *J Food Protection* 1993; 56: 980-982.