

Les mollusques bivalves, des aliments dangereux ?

CHINA B., DE SCHAETZEN M.-A., DAUBE G.

Université de Liège, Faculté de Médecine Vétérinaire, Laboratoire de microbiologie des denrées alimentaires. Sart Tilman B43b 4000 Liège, Belgique.

Correspondance : Dr Bernard China
Tél. : 04 366 40 17 – Fax : 04 366 40 16 – Email : bchina@ulg.ac.be

RESUME : Les produits de la mer sont des denrées alimentaires consommées dans le monde entier. Les fruits de mer et en particulier les mollusques bivalves sont consommés crus ou peu cuits, il en résulte que ce sont des aliments à risque du point de vue des toxi-infections alimentaires. De plus, ces animaux filtrent l'eau et concentrent les microorganismes et les toxines. Les risques sont multiples : bactéries (*Clostridium*, *Vibrio*), virus (norovirus, hépatite A) et les biotoxines (paralysante, neurotoxique, diarrhéique, amnésiante) produites par le phytoplancton. La norme européenne 91/492/EC fixe les critères microbiologiques et toxicologiques pour la mise en vente de ces produits. Cependant, faute de méthodes diagnostiques fiables, les virus ont été omis de cette directive. Or, il s'agit d'une cause majeure de toxi-infection due à l'ingestion de ce type de produits. Le nombre important de foyers épidémiques dans le monde, dus à la consommation de « fruits de mer » indique que ceux-ci doivent faire l'objet d'une surveillance toute particulière. Mais pour cela, il faut disposer d'outils diagnostiques performants.

Le but de cette revue est de décrire les principaux dangers biologiques pour la santé humaine (bactéries, virus, biotoxines) liés à la consommation de fruits de mer.

1. INTRODUCTION

Les poissons et les fruits de mer sont la deuxième source de protéines animales derrière la viande (International Commission on Microbiological Specifications for Food, 2000). En 2000, on a produit dans le monde 130 millions de tonnes de poissons et de fruits de mer (Food and Agriculture Organization, 2002). Les mollusques bivalves ou lamelli-branches sont des invertébrés constitués d'une coquille à 2 valves, de branchies lamelleuses et d'un pied en forme de socle (moules, huîtres, coquilles Saint-Jacques,...). Ils filtrent l'eau et concentrent les particules, les toxines et les microorganismes. De plus, ce sont des aliments consommés souvent crus (huîtres) ou peu cuits (moules). Les biotoxines, les bactéries et les virus qu'ils contiennent sont donc mal éliminés. Il en résulte de nombreuses toxi-infections alimentaires dues à l'ingestion de ce type d'aliments (Smith DeWaal *et al.*, 2001; Potasman *et al.*, 2002). Ainsi, aux USA, entre 1990 et 2000, on a répertorié 66 épidémies impliquant

3299 cas dues à l'ingestion de mollusques bivalves (Smith DeWaal *et al.*, 2001).

La directive européenne 91/492/EC (Communauté européenne, 1991) définit les critères microbiologiques pour les mollusques bivalves. Cette directive établit que la qualité microbiologique de ces aliments doit être contrôlée en mesurant les coliformes fécaux (moins de 300 pour 100 g), *Escherichia coli* (230 pour 100 g) et les salmonelles (absence). Mais cette directive n'établit pas de critères microbiologiques spécifiques concernant la présence de virus entériques « en l'absence de techniques de routine pour la recherche de virus et la fixation de normes virologiques »

En ce qui concerne les toxines, le taux de « *paralytic shellfish poison* » (PSP) ne doit pas dépasser 80 µg pour 100 g; la « *diarrheic shellfish poison* » (DSP) ne doit pas être détectée, le taux de « *amnesic shellfish poisoning* » (ASP) dans les parties comestibles des mollusques ne doit pas dépasser 20 µg d'acide domoïque par gramme (Communauté européenne, 1991).

La directive européenne 1999/313/CE (Communauté européenne, 1999) établit un réseau de laboratoires de référence pour contrôler la contamination bactériologique et virale des mollusques bivalve. Elle établit un laboratoire communautaire de référence (CEFAS, Weymouth, Angleterre) ainsi que des laboratoires de référence dans chaque pays de l'union européenne. Nous sommes le laboratoire national de référence pour la Belgique et le Grand-Duché du Luxembourg.

Chaque laboratoire national de référence est chargé des tâches suivantes :

- a) coordonner les activités des laboratoires nationaux chargés des analyses bactériologiques et virales des mollusques et virales des mollusques bivalves dans l'état membre ;
- b) assister l'autorité compétente de l'État membre dans l'organisation du système de contrôle des contaminations bactériologiques et virales des mollusques bivalves ;
- c) organiser périodiquement des essais comparatifs entre les diffé-

rents laboratoires nationaux chargés des dites analyses ;

- d) assurer la diffusion des informations fournies par le laboratoire communautaire de référence auprès des autorités compétentes et des laboratoires nationaux chargés des dites analyses.

Les laboratoires nationaux de référence collaborent avec le laboratoire communautaire de référence.

Le laboratoire communautaire de référence est chargé des tâches suivantes :

- a) fournir des informations sur les méthodes d'analyse et les essais comparatifs aux laboratoires nationaux de référence ;
- b) coordonner l'application par les laboratoires nationaux de référence des méthodes visées au point a), en organisant notamment des essais comparatifs ;
- c) coordonner la recherche de nouvelles méthodes d'analyse et informer les laboratoires nationaux de référence des progrès accomplis dans ce domaine ;
- d) organiser des cours de formation et de perfectionnement pour le personnel des laboratoires nationaux de référence ;
- e) collaborer avec les laboratoires chargés des analyses bactériologiques et virales des mollusques bivalves dans les pays tiers ;
- f) fournir une assistance technique et scientifique à la Commission, notamment en cas de contestation de résultats d'analyse entre les états membres ;
- g) aider les laboratoires nationaux de référence à mettre en oeuvre un système approprié d'assurance de la qualité basé sur les principes de bonnes pratiques de laboratoires (GLP) et sur les critères ISO 17025.

Cet article se veut une revue non exhaustive des principales causes de toxi-infections d'origine alimentaires dues à l'ingestion de mollusques bivalves. Il s'agit principalement des bactéries, des virus et des biotoxines.

LES BACTÉRIES

Les indicateurs

On appelle un indicateur bactériologique, une bactérie dont la présence et/ou la quantité à un endroit révèle un problème écologique au sens large. Dans le cas des mollusques bivalves, on s'intéresse aux indicateurs de contamination fécale qui est un indicateur d'un problème d'hygiène. La norme 91/492/EC tient en compte les coliformes fécaux dont le nombre ne doit pas excéder 300/100 g de chair pour que l'aliment soit déclaré propre à la consommation humaine et les *E. coli* dont le nombre ne doit pas dépasser 230/100 g.

Les coliformes fécaux appartiennent à une famille de bactéries hôtes naturels des matières fécales de l'homme ou des animaux à sang chaud. Dans ce groupe, on retrouve principalement des bactéries commensales comme *E. coli*. Quand ils sont détectés dans un aliment, ils signalent une contamination par des matières fécales humaines ou animales, ce qui est la marque d'un manque d'hygiène lors d'une étape de la préparation de l'aliment. Si ce nombre est élevé, il y a de plus un risque que des organismes pathogènes soient aussi présents dans l'aliment. Il s'agit donc d'une méthode d'évaluation du risque. La méthode utilisée au laboratoire est la norme française NF V 08-060 (Agence française de normalisation, 2002). Par définition, selon cette norme, les coliformes fécaux sont considérés comme les bactéries qui à 44°C fermentent le lactose avec production de gaz (aspect coliforme) dans les conditions du test. Ceci implique notamment une croissance dans un milieu contenant des sels biliaires (aspect fécal). Les *E. coli* (qui sont aussi des coliformes fécaux) forment de l'indole à partir du tryptophane (Agence française de normalisation, 2002).

En fonction des nombres trouvés, les zones de pêches sont classées en diverses catégories.

En classe A (< 230 *E. coli*/100 g) les mollusques ne nécessitent pas de traitement avant la consommation, en classe B (< 4600 *E. coli*/100 g) ils nécessitent une épuration de courte durée dans des bassins d'eau de mer propre (Richards, 1988), en classe C (< 60 000 coliformes fécaux/100 g), ils nécessitent une épuration de 2 mois dans de l'eau de mer propre.

De plus, la norme spécifie l'absence de *Salmonella spp.* dans 100 g de chair. D'autres indicateurs bactériens de contamination fécale ont été utilisés comme *Clostridium perfringens* (Muniain-Mujika *et al.*, 2003).

La flore saprophyte

Après capture, les mollusques sont refroidis ce qui entraîne une modification de la microflore. Ainsi, le facteur le plus important influençant la composition de la microflore est la température. Les populations bactériennes issues des mollusques venant d'eaux tempérées sont des bactéries psychrotrophes car la température de l'eau est inférieure à 10°C. Mais la température en surface peut augmenter durant des périodes de fortes chaleurs avec une augmentation des bactéries mésophiles pour les mollusques de surface. On pense souvent que la microflore des mollusques marins est halophile. En fait, les microorganismes sont plutôt halotolérants, ils peuvent croître dans une large gamme de salinité avec un optimum situé à 2 ou 3 % de NaCl. Ceci est renforcé par le fait que les mollusques sont souvent conservés en glace ce qui diminue la salinité initiale. Les bactéries isolées en surface sont des aérobies facultatifs comme *Vibrio spp.* Les bactéries anaérobies sont retrouvées en profondeur. En surface, on trouve surtout des bactéries à Gram négatif pour les mollusques d'eaux tempérées et des gram positives pour les mollusques d'eau chaude. La microflore des mollusques des mers froides est remarquablement constant et comprend les genres : *Psychrobacter*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Shewanella*, *Flavobacterium*, *Cytophaga* et *Vibrio*. Avec *Vibrio spp.* comme flore dominante. Pour les poissons et mollusques des mers chaudes on trouve les genres : *Bacillus*, *Micrococcus* et *Corynebacterium*. Pour les animaux d'eau douce, la même situation se présente mais le genre *Aeromonas* remplace le genre *Vibrio*. Puisque les mollusques sont associés à une exploitation côtière, leur microflore peut refléter des influences terrestres et des Enterobactéries et des *Streptococcaceae* sont présents (International Commission on Microbiological Specifications for Food, 2000).

Tableau I: Principaux indicateurs microbiologiques et principaux microorganismes pathogènes trouvés dans les mollusques bivalves.

Bactéries	Virus
Indicateurs	Indicateurs
<i>Escherichia coli</i> , <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Salmonella spp</i>	Bacteriophages (anti-mâle, bacteroïdes fragilis)
Pathogènes principaux	Pathogènes principaux
<i>Vibrio cholerae</i> O1 et O139	Hépatite A (ssRNA) ; Norovirus (ssRNA)
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Pathogènes secondaires
<i>Vibrio vulnificus</i>	Rotavirus (dsDNA), Adénovirus (dsADN)
<i>Clostridium botulinum</i>	Astrovirus (ssRNA), Poliovirus (ssDNA)
Pathogènes secondaires	
<i>Campylobacter jejuni</i> , <i>Shigella spp.</i> ,	
<i>Aeromonas hydrophyla</i> , <i>Edwardsiella tarda</i>	
<i>Pleisomonas shigelloides</i> , <i>Listeria monocytogenes</i>	
<i>Yersinia enterocolitica</i> , <i>E. coli</i> O157 :H7, <i>S. aureus</i>	

Les bactéries pathogènes

Parmi les bactéries pathogènes qui peuvent contaminer les fruits de mer, les principales appartiennent au genre *Clostridium* et au genre *Vibrio* (Hackney et Dicharry, 1988) (tableau I). Mais d'autres pathogènes comme *Listeria monocytogenes* sont aussi isolés (Elliot et Kvenberg, 2000 ; Rocourt *et al.*, 2000).

Dans le groupe de clostridies, on s'intéressera principalement à *Clostridium botulinum* et à *Clostridium perfringens*, dans celui des *Vibrio*, à *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* et *V. vulnificus*.

Clostridies

Les clostridies sont des bacilles à Gram positifs, anaérobies strictes, sporulées et présentant un pourcentage en G+C inférieur à 30%.

Clostridium perfringens: pathogénie et signes cliniques

C. perfringens est une espèce cosmopolite. Sa capacité de sporulation lui permet de mieux résister dans le milieu extérieur et donc de se propager, directement ou par l'intermédiaire d'aliments souillés. Cette bactérie peut synthétiser toute une série de 13 enzymes ou toxines ce qui est à la base de son pouvoir pathogène.

Les souches de *C. perfringens* se répartissent en 5 types (A, B, C, D, E) selon leur capacité de synthèse de quatre exotoxines létales pour la souris et appelées, pour cette raison, toxines létales majeures (α , β , ϵ , ι) (Petit *et al.*, 1999). Une souche de base constituée d'un *C. perfringens* type A non productrice d'entérotoxine est définie, à laquelle viennent s'ajouter diverses potentialités supplémentaires (toxines β , ϵ , ι ou entérotoxine). La possibilité pour les gènes de la majorité de ces facteurs d'être portés par des supports extrachromosomiques mobiles est un argument en faveur de cette classification. L'alpha-toxine est codée par un gène situé sur le chromosome (Canard et Cole, 1989) tandis que les gènes codant pour les toxines bêta, epsilon et iota sont plasmidiques (Katayama *et al.*, 1996). Le gène de l'entérotoxine est lui situé selon les souches, soit sur le chromosome, soit sur un plasmide (Cornillot *et al.*, 1995).

C. perfringens est responsable de toxi-infections alimentaires chez l'homme. La maladie est due à la production de l'entérotoxine. Elle est produite dans le petit intestin après l'ingestion de 10^7 bactéries entérotoxigènes du type A. Environ 8-12 h après ingestion de la nourriture contaminée, les symptômes apparaissent avec des douleurs abdominales, des nausées et de la diarrhée. Les

symptômes perdurent 24 h. La mort qui peut survenir suite à la déshydratation est observée surtout chez les personnes âgées et les enfants mais la plupart des cas sont relativement bénins. Les *C. perfringens* du type C sont aussi responsables d'entérites nécrotiques chez l'homme. Le temps d'incubation est de 5 à 6 h, et les symptômes débutent par des crampes intestinales sévères, de la dysenterie, parfois des vomissements suivis d'une inflammation nécrotique du petit intestin. En l'absence de traitement, le taux de mortalité est de l'ordre de 20%. La maladie est due à la production de la toxine bêta avec la contribution de perfringolysine et de la toxine delta. Cette maladie est devenue très rare en Europe mais est encore endémique en Papouasie Nouvelle Guinée en raison de leurs habitudes alimentaires (Brynstad et Granum, 2002).

C. perfringens : épidémiologie

En Norvège, *C. perfringens* fut la cause la plus fréquente de toxi-infections alimentaires (1/3 des cas) entre 1988 et 1995 (Brynstad et Granum, 2002). Le nombre de cas varie entre 202 et 1240 aux USA, 288 et 4571 au Japon et 562 et 1716 en Grande-Bretagne durant la période 1983-1994 (Labbé, 2002). En ce qui concerne les produits de la mer, le « Centers for Disease Control and prevention »

(CDC) rapporta en mars 1995 une épidémie liée à *C. perfringens* avec 57 cas décrits suite à l'ingestion de mollusques bivalves ainsi qu'une épidémie en décembre 1996 ayant touché 25 personnes suite à l'ingestion de poisson (Smith DeWaal, 2001).

C. botulinum : pathogénie et signes cliniques

C. botulinum désigne un groupe de *Clostridium* capables de déterminer chez l'homme et chez les mammifères une neuro-intoxication appelée botulisme (de botula : la saucisse). L'intoxication est consécutive à l'ingestion d'une toxine préformée dans l'aliment responsable de cette intoxication. Chez l'homme, il s'agit d'une intoxication au sens strict, sans élément infectieux surajouté résultant d'une toxi-infection d'origine alimentaire ou d'une blessure. Il existe sept toxines botuliques différenciables immunologiquement (A à G) ce qui conduit à diviser ce groupe de *Clostridium* très hétérogène en sept toxinotypes de A à G.

Certains préconisent d'appeler *C. botulinum* de type G, *C. argentinense*. Les toxinotypes A, B, E et F sont associés au botulisme humain alors que les types C et D sont associés au botulisme des animaux.

C. botulinum est une bactérie présente dans le sol, l'eau et les sédiments aquatiques. On peut aussi l'isoler du contenu intestinal des vertébrés (mammifères, poissons,...) et des invertébrés (crabes, diptères) chez lesquels ses spores peuvent transiter, sans pour cela donner lieu à des symptômes. On notera que certains types de *C. botulinum* ont pour habitat le milieu intestinal plutôt que le sol. C'est en particulier le cas du type C et D. Le type E qui contamine les poissons et les mollusques a un habitat tellurique mais les spores sont concentrées dans les grandes réserves d'eau par suite de l'érosion (Hyytiä-Tress, 1999).

C. botulinum : épidémiologie

Lors de la dernière décennie, on a dénombré en moyenne 450 épidémies à *C. botulinum* représentant 930 cas dans le monde (Hateway, 1995). 34 % de ces épidémies sont dues au type A, 52 % au type B et 12 % au type E. Le type F est par contre très rare. Selon le CDC, 13 épidémies à *C. botulinum*

(impliquant 40 cas) dues à l'ingestion de produits de la mer ont été rapportées aux USA entre 1990 et 1998 (Smith DeWaal *et al.*, 2001). En France entre 1991 et 2000, on a répertorié 142 foyers pour 278 cas dont 5 mortels et 87 % des cas étaient du type B (Haeghebaert *et al.*, 2003).

Vibrio

Le genre *Vibrio* est assez hétérogène. Il regroupe des bacilles à gram négatif, anaérobies facultatifs, oxydase positif et mobiles. La croissance des vibrios est toujours stimulée par l'ion Na⁺. Mais les besoins en NaCl dans le milieu varient selon les espèces (5-15 mM pour *V. cholerae*, 140-260 mM pour *V. vulnificus* et *V. parahaemolyticus*). Les principales espèces pathogènes associées aux fruits de mer sont : *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae*, et *V. vulnificus*.

Vibrio parahaemolyticus : pathogénie et signes cliniques

V. parahaemolyticus est une espèce halophile qui cause des gastro-entérites chez l'homme. Les toxi-infections alimentaires causées par ce pathogène sont généralement associées avec la consommation de fruits de mer (Wong et Lin, 2001). Les manifestations cliniques incluent de la diarrhée, des crampes abdominales, les nausées, les vomissements, les céphalées, la fièvre. La période d'incubation varie de 4 à 96 heures (Joseph *et al.*, 1982). On reconnaît 13 groupes antigéniques O et 71 groupes antigéniques K (Iguchi *et al.*, 1995). Plusieurs facteurs de virulence de type hémolysine ont été mis en évidence : l'hémolysine thermostable directe (TDH), l'hémolysine thermolabile (TLH) et l'hémolysine « *thermostable related hemolysin* » (TRH).

L'hémolysine thermostable directe est produite par la plupart des souches de *V. parahaemolyticus* isolées de patients souffrant de gastro-entérites. TDH est une protéine de 23 kDa qui montre une activité hémolytique sur divers types d'hématies. Cette activité n'est pas inactivée par un traitement à 100°C pendant 10 minutes. TDH possède également une activité entérotoxigénique, cytotoxique, cardiotoxique et létale chez la souris et induit une augmentation de la perméabilité vasculaire sur la peau de lapin (Honda et Iida, 1993). TDH

altère le flux d'ions intestinaux entraînant une diarrhée. La protéine purifiée induit la sécrétion d'ions en utilisant le Ca²⁺ comme second messager (Raimondi *et al.*, 1995; Raimondi *et al.*, 2000). Le récepteur cellulaire pour TDH semble être le ganglioside GT1b (Olivier et Kaper, 1997). Les souches hémolytiques de *V. parahaemolyticus* contiennent deux copies différentes du gène *tdh* (*tdh1* et *tdh2*). Les souches faiblement hémolytiques ne possèdent qu'une seule copie du gène et les souches non-hémolytiques ne possèdent pas de gène *tdh*. Un gène *tdh*-like est trouvé aussi dans d'autres espèces de *Vibrio* (Nishibuchi et Kaper, 1995).

La toxine TRH est une protéine de 23 kDa immunogénétiquement liée à la toxine TDH (Honda *et al.*, 1988). TRH est moins thermorésistante que TDH. Le gène *trh* montre 69 % d'identité avec le gène *tdh2*. Il semble que les gènes *trh* et *tdh* ont évolué à partir d'un ancêtre commun.

La toxine thermolabile ne semble pas liée à la virulence mais le gène *tl* est présent dans toutes les souches de *V. parahaemolyticus* ce qui en fait un bon marqueur épidémiologique (Peterson, 2000).

V. parahaemolyticus : épidémiologie

Selon le rapport du CDC, entre 1990 et 2000, on a recensé aux USA et au Canada, 19 épidémies à *V. parahaemolyticus* regroupant 740 cas suite à l'ingestion de mollusques bivalves. On pointera deux épidémies spectaculaires, une en mai 1997 ayant touché 209 personnes suite à l'ingestion d'huîtres et une autre en juin 1998 regroupant 416 cas toujours liés à la consommation d'huîtres (Smith DeWaal *et al.*, 2001). De nombreuses épidémies ont aussi été rapportées en Inde en 1996 (Okuda *et al.*, 1997). Une épidémie est survenue en 1997 dans un régiment du Var en France touchant 44 patients suite à l'ingestion de fruits de mer (Lemoine *et al.*, 1999). Les sérotypes les plus fréquemment isolés sont : 03:K6, O1NT et 04:K68. Une comparaison moléculaire des souches 03:K6 responsables d'épidémies aux USA et en Asie entre 1996 et 1999 indique le caractère clonale de la souche et le caractère pandémique de l'épidémie (Bag *et al.*, 1999; Chowdhury *et al.*, 2000; Matsumoto *et al.*, 2000). On note de plus un effet saisonnier, en effet, la

majorité des cas survenaient lors des mois chauds (mai à août).

V. cholerae : pathogénie et signes cliniques

V. cholerae est l'agent du choléra qui se caractérise par une diarrhée sévère. *V. cholerae* produit la toxine du Choléra (CT) qui est composée de 5 sous-unités B de 11 600 Da et d'une sous-unité A de 27 200 Da. La sous-unité B permet la fixation de la toxine au ganglioside GM1 alors que la sous-unité A est clivée en une sous-unité active A1 et une sous-unité A2. La sous-unité A1 active la production d'AMP cyclique qui stimule les pompes ioniques entraînant un déséquilibre électrolytique et une production d'eau dans la lumière intestinale. Les sous-unités A et B de la toxine du choléra sont codées par l'opéron *ctxAB* qui est porté par un phage lysogénique (Waldor et Mekalanos, 1996). A côté de la toxine CT, d'autres facteurs de virulence ont été identifiés. C'est le cas de la toxine Zot (Zonula occludens Toxin) qui augmente la perméabilité de la muqueuse du petit intestin et affecte la structure des jonctions serrées (Trucksis *et al.*, 1993). Les fimbriae TCP (*toxin-coregulated pilus*) sont probablement impliqués dans l'adhérence à l'épithélium intestinal. Les protéines ACF (accessory colonisation factor) A à D sont nécessaires à une colonisation intestinale efficace (Peterson et Mekalanos, 1988). Les hémagglutinines *MRSHA* (mannose-sensitive hemagglutinin) et *MFRHA* (mannose-fucose resistant hemagglutinin) codent pour des adhésines mais leur rôle dans la pathogénie de *V. cholerae* n'est pas clair (Peterson, 2000).

V. cholerae : épidémiologie

La pandémie cholérique actuelle, la septième, due à *V. cholerae* O1, est partie d'Indonésie en 1961 et a envahi successivement l'Asie en 1962, le Moyen-Orient et une partie de l'Europe en 1965, l'Afrique en 1970 et, après une période d'accalmie de 1975 à 1990, l'Amérique Latine en 1991. Par ailleurs, l'apparition en Asie, à la fin de l'année 1992, d'une nouvelle souche de vibron cholérique (*V. cholerae* O139) a marqué le début de ce qui sera peut-être la huitième pandémie cholérique. Le choléra reste donc aujourd'hui une maladie grave à la fois pour les individus

et pour les collectivités. Enfin, à la suite de la dégradation des conditions socio-économiques survenue ces dernières années dans de nombreuses régions du monde, le nombre de personnes exposées à cette maladie a augmenté de façon spectaculaire, créant les conditions d'un problème majeur à l'échelle de la planète.

Trois foyers de *V. cholerae* impliquant 14 cas ont été identifiés aux USA suite à l'ingestion de mollusques en avril 1991 (Smith DeWaal *et al.*, 2001). En 1994, 300 cas de choléra ont été détectés en Albanie dans 40 % des cas on a incriminé le sérotype *V. cholerae* O1 (Luizzi *et al.*, 1995). En 1995, on a répertorié 3 cas de choléra au Canada lié à la consommation de fruits de mer (Werker *et al.*, 1996).

V. vulnificus : pathogénie et signes cliniques

V. vulnificus semble capable de provoquer des septicémies quelques jours après l'ingestion de fruits de mer contaminés. Cette septicémie est particulièrement sévère puisque le taux de mortalité est de 50 %. C'est un pathogène associé aux huîtres. Des études récentes par électrophorèse en champs pulsé ont montré qu'une douzaine d'huîtres peut contenir plus de 100 souches différentes dont seules certaines sont pathogènes pour l'homme (Jackson *et al.*, 1997). Parmi les facteurs de virulence, on note, des sidérophores, une cytolysine, une capsule, une protéase, une élastase,...

Les isolats cliniques de *V. vulnificus* montrent un taux de mortalité élevé chez les animaux de laboratoire. *V. vulnificus* est rapidement létale quand elle est injectée intrapéritonéalement ou par voie sous-cutanée chez la souris. Le fait d'injecter du fer aux animaux, diminue la dose létale 50 de *V. vulnificus* d'un facteur 10^5 à 10^6 . *V. vulnificus* produit deux sidérophores : la vulnibactine (un sidérophore de la famille des phénolates) et un sydérophore de la famille des hydroxamates (Peterson, 2000). La vulnibactine est capable d'utiliser le fer lié à la transferrine et à la lactoferrine du sérum humain après clivage de ces protéines par une protéase sécrétée par *V. vulnificus* (Okujo *et al.*, 1996).

V. vulnificus produit une hémolysine thermostable qui est létale à des doses de l'ordre du nanogramme pour la souris. Cette protéine lyse les héma-

ties de diverses espèces animales, elle exerce une activité cytotoxique pour des cellules en culture et augmente la perméabilité vasculaire (Miyoshi *et al.*, 1993).

V. vulnificus produit une capsule polysaccharidique qui augmente la capacité de *V. vulnificus* d'initier l'infection. Des mutants incapables de produire la capsule montrent une dose létale 50 augmentée de 10 000 fois. La capsule protège la bactérie contre l'effet bactéricide du sérum et à la phagocytose (Olivier et Kaper, 1997). La capsule utilisée comme vaccin montre un effet protecteur chez la souris (Devi *et al.*, 1995).

V. vulnificus : épidémiologie

V. vulnificus est un hôte habituel des estuaires du monde entier, mais la plupart des cas humains nous viennent des USA. En effet, *V. vulnificus* est responsable de 95 % des morts liées aux « fruits de mer » aux USA et est la cause principale de morbidité liée à la nourriture en Floride (Hlady *et al.*, 1993). En 1996, le CDC a recensé 3 cas mortels à Los Angeles (Centers for Disease Control and prevention, 1996). En 1999, le CDC a recensé 83 cas dont 31 mortels (Smith DeWaal, 2001). De mai à septembre 2000, 10 personnes résidant au Texas furent atteintes de septicémies à *V. vulnificus* suite à l'ingestion d'huîtres crues, avec une mortalité de 50 % (Robinson *et al.*, 2000).

LES VIRUS

Les indicateurs

Les bactériophages sont des candidats intéressants comme indicateurs de la présence de virus entériques dans l'eau et les produits qui en dérivent. Les bactériophages sont aussi des virus mais leur détection est plus simple que celle des entérovirus. Les caractéristiques principales de ces bactériophages pour être utilisés comme indicateurs sont : (i) la spécificité c'est-à-dire présence uniquement dans les matières fécales, (ii) ne pas se multiplier dans l'environnement, (iii) être présent en quantité plus importante que les virus entériques, (iv) détection aisée et peu onéreuse, (v) leurs caractéristiques dans l'eau doivent mimer celles des entérovirus (Leclerc *et al.*, 2000). Trois

groupes de bactériophages ont été proposés comme indicateurs des virus entériques : les coliphages somatiques (International Organization for Standardization, 1995), les coliphages anti-mâle à ARN ou phages F-RNA (Havelaar et Hogenboom, 1984; International Organization for Standardization, 1996) qui se lient aux pili sexuels des bactéries F+ et les phages infectant *Bacteroides fragilis* (Gantzer et al., 1998; International Organization for Standardization, 2001). Les bacteriophages qui infectent *E. coli* et les autres coliformes sont appelés des coliphages. Un des problèmes avec l'utilisation de la présence des coliphages comme indicateur de contamination fécale et de la présence de virus entériques, est leur manque de spécificité pour leur hôte bactérien. Ainsi, les coliphages anti-mâle sont généralement spécifiques d'*E. coli*, mais ils peuvent aussi se répliquer dans d'autres entérobactéries. De plus, un coliforme F+ peut subir une attaque de la part d'un phage anti-mâle aussi bien que d'un phage somatique. Ainsi, puisqu'ils ne sont pas spécifiques de *E. coli* et que de plus, ils ne sont pas retrouvés dans les matières fécales humaines, ils ne peuvent être considérés comme de bons indicateurs de la présence d'une contamination fécale et de virus entériques (Leclerc et al., 2000). Les coliphages somatiques quant à eux ne sont pas non plus de bons indicateurs de contamination fécale car leurs hôtes ne sont pas nécessairement d'origine fécale. La multiplication des coliphages somatiques tout comme des phages anti-mâle peut conduire à une analyse faussement positive (Leclerc et al., 2000). Un autre problème, est le choix de la souche bactérienne pour le test de multiplication des phages. En effet, de nombreuses souches différentes ont été utilisées (Leclerc et al., 2000). Une bonne souche hôte doit : (i) être facile à manipuler, (ii) être stable, (iii) posséder une résistance à un antibiotique, (iv) ne pas contenir des phages lysogéniques qui pourraient s'activer et donner des résultats faussement positifs. Pour les phages F+ on utilise la souche de *S. typhimurium* WG49 dans laquelle, un plasmide a été introduit (Havelaar et Hogenboom, 1984; International Organization for Standardization, 1995) alors que pour les phages somatiques, c'est la souche de *E. coli* C (ATCC13706) et son mutant résistant à l'acide nalidixique *E. coli*

souche CN qui sont utilisés (Havelaar et Hogenboom, 1983; International Organization for Standardization, 1996).

Bacteroides fragilis tout comme *E. coli* est présent en grand nombre dans le colon de l'homme. Les bacteriophages actifs contre cette bactérie anaérobie, en particulier la souche *B. fragilis* HSP40, ont montré un grand degré de spécificité (Tartera et al., 1989). Les phages de *B. fragilis* ont été détectés en grand nombre dans les matières fécales humaines et dans les eaux souillées et semble refléter la présence majoritaire de *B. fragilis* (Grabow et al., 1995). Les phages lytiques pour la souche de référence *B. fragilis* HSP40 ne sont isolés que d'eaux souillées et non d'eaux propres (Araujo et al., 1997). Gantzer et collaborateurs (1998) tentèrent de comparer les performances des bacteriophages de *B. fragilis* et des coliphages somatiques comme indicateurs de la présence d'entérovirus. Ils montrèrent que les bactériophages de *B. fragilis* étaient de bons indicateurs de la présence d'entérovirus. De même, une étude plus récente (Munian-mujika et al., 2003) indiqua que la probabilité de détecter des virus humains dans les mollusques augmentait quand des phages de *B. fragilis* étaient trouvés. Ces observations couplées avec l'incapacité de *B. fragilis* de se multiplier dans l'eau ou les sédiments, suggèrent que ces phages sont de meilleurs indicateurs de contamination fécale et de présence de virus pathogènes pour l'homme que les coliphages somatiques ou les phages anti-mâle (Leclerc, 2000).

Les virus pathogènes pour l'homme

Pathogénie et signes cliniques

Parmi les maladies virales transmises par les « fruits de mer », on distingue (i) les virus responsables de gastro-entérites comme les norovirus, les rotavirus, les adénovirus entériques et les astrovirus (ii) les virus responsables d'hépatite à transmission oro-fécale dont le principal est le virus de l'hépatite A (VHA) et (iii) les Enterovirus comme le virus de la poliomyélite.

L'importance relative de ces différents virus comme cause de toxi-

infection alimentaire n'est pas connue, mais il semble clair que les norovirus et le VHA sont les causes principales d'épidémie et sont en recrudescence ces dernières années.

Le virus de Norwalk (l'archétype des norovirus) a été découvert par microscopie électronique dans des matières fécales collectées lors d'une épidémie de gastro-entérites en 1968 dans une école élémentaire de Norwalk (USA). Il est petit (30 nm), non enveloppé, sphérique et possède un génome sous forme d'ARN simple brin de 7,3 à 7,6 kb avec une polarité positive.

Les signes cliniques sont, après une période de 1-3 jours, de la fièvre, des vomissements, de la diarrhée et des céphalées. Peu de choses sont connues en ce qui concerne la pathogénie de ce virus. Au niveau anatomo-pathologique, on constate un raccourcissement des villosités, une hypertrophie des cryptes, ainsi qu'une réponse inflammatoire dans la *lamina propria* avec infiltration de leucocytes polymorphonucléaires et de lymphocytes. Le développement de nouveaux outils diagnostiques a permis de déterminer que les norovirus sont des causes importantes de gastro-entérites chez les adultes avec une propension à causer des épidémies. Mais c'est aussi une cause majeure de gastro-entérites sporadiques. Les personnes à risque sont les jeunes enfants et les personnes âgées. Le norovirus se transmet par contact direct de personne à personne ou par contamination indirecte via l'eau et la nourriture.

A côté des virus responsables de gastro-entérites, on trouve les virus responsables d'hépatite. Ils se divisent en virus transmis par voie entérique (VHA et VHE) et les virus transmis par voie parentérale (hépatites B, C, D et G). Dans les toxi-infections alimentaires, on trouve essentiellement les virus entériques. Le VHE est endémique dans certaines régions du monde. Il s'agit d'un virus transmis essentiellement par l'eau de boisson souillée. Jusqu'à présent aucun cas de VHE n'a été lié aux fruits de mer et il ne sera donc pas développé ici (pour revue, Worm et al., 2002). Par contre, le VHA est fréquemment associé aux fruits de mer. Il s'agit d'un virus de la famille des *Picornaviridae* qui comprend aussi les entérovirus. Le VHA est petit (27 à 32 nm), non enveloppé, sphérique avec un génome à ARN simple brin positif de 7,5 kb. L'infection à VHA peut être sympto-

matique ou non. L'ingestion se fait par l'eau ou les aliments souillés. La période d'incubation est de 30 jours. Les premiers symptômes sont peu spécifiques (fièvre, fatigue, nausée et problème abdominaux) suivis d'une hépatite une ou deux semaines plus tard. La pathogénie exacte n'est pas connue. VHA se transmet par voie oro-fécale de personne à personne ou via la nourriture. Ce sont les mollusques bivalves qui sont la source principale de toxi-infections alimentaires virales à cause de leur pouvoir filtrant qui a un effet concentrant. La persistance de VHA a été mesurée dans les huîtres pendant 6 semaines, les virus persistaient 3 semaines après l'inoculation (Kingsley et Richards, 2003). Chez l'humain, l'infectiosité est maximale pendant la deuxième moitié de la période d'incubation et persiste pendant quelques jours après l'apparition de l'ictère. Habituellement, la plupart des cas ne sont pas infectieux après la première semaine qui suit l'apparition de l'ictère, le VHA est excrété sous une forme concentrée dans les fèces pendant une courte période; l'excrétion est maximale une à deux semaines avant l'apparition des symptômes (Koopmans *et al.*, 2002; Scipioni *et al.*, 2000). On a détecté du VHA jusqu'à trois mois après la disparition des symptômes (Santé Canada, 2001).

Epidémiologie

Le CDC a répertorié 14 foyers d'intoxication à norovirus comprenant 2132 cas suite à l'ingestion de mollusques bivalves sur la période de 1990 à 2000 (Smith DeWaal *et al.*, 2001). Mais selon les estimations de la «*Food and Drug Association*» (FDA), les norovirus seraient responsables d'environ 180 000 gastro-entérites aux USA, par an (Glass *et al.*, 2000). Le nombre de cas d'infection à norovirus répertorié en Angleterre et au Pays de Galles était de 3029 pour les 10 premiers mois de 2002 (British Broadcast Corporation, 2003). Une épidémie à norovirus a été mise en évidence à Rotterdam en janvier 1999, avec 107 cas déclarés (Ronveaux *et al.*, 2000).

Une épidémie due au VHA est survenue en 1996 dans la région des Pouilles en Italie. Elle a atteint 886 personnes suite à l'ingestion de fruits de mer crus (Lopalco *et al.*, 1996).

En octobre 1999, en Espagne, on a recensé 184 cas d'hépatite A dus à l'ingestion de mollusques (Sanchez *et al.*, 2002).

LES BIOTOXINES

Pouvoir pathogène et signes cliniques

Les algues unicellulaires microscopiques composent de façon importante le plancton dont les mollusques se nourrissent. Dans des conditions favorables de lumière, de température, de salinité, de nutriments, les algues peuvent se multiplier rapidement pour former des bouquets contenant des millions de cellules par litre. Sur les 2000 espèces recensées de dinoflagellates, environ 30 espèces produisent des toxines qui peuvent causer des pathologies humaines dues à l'ingestion de mollusques (Holmes et Teo, 2002). Les empoisonnements les plus communs dus à des mollusques sont liés à l'ingestion de : la toxine PSP (paralytic shellfish poisoning) qui dans les cas extrêmes peut entraîner la mort par paralysie respiratoire (Gallacher et Smith, 1999), la toxine DSP (diarrhetic shellfish poisoning) qui cause des problèmes gastro-intestinaux sévères et peut favoriser le développement de tumeurs de l'estomac, la toxine NSP (neurotoxic shellfish poisoning) qui cause des détresses respiratoires et la toxine ASP (amnesic shellfish poisoning) qui peut conduire à des dommages cérébraux permanents avec des pertes de mémoire (Quilliam, 1999; Australia New Zealand Food Authority, 2001).

Epidémiologie

Une épidémie d'intoxications diarrhéiques dues aux fruits de mer à été rapporté à Anvers

En février 2002. En tout, 403 cas répondant à la définition d'une gastro-entérite. Les analyses virologiques et bactériologiques réalisées dans notre faculté se sont montrées négatives alors que les recherches de toxines réalisées à l'institut de santé public à montré que le taux en acide okadaïque (de la famille des DSP) était supérieur aux normes autorisées et que ces concentrations étaient suffisantes pour entraîner une intoxication chez l'homme et notamment un

syndrome diarrhéique lié à l'ingestion de coquillages (De Schrijver *et al.*, 2002). Le CDC a recensé (entre 1990 et 2000) 17 foyers avec 95 cas dus à des biotoxines présentes dans les mollusques bivalves. Douze de ces foyers épidémiques étaient dus à la toxine PSP (Smith DeWaal *et al.*, 2001).

CONCLUSION

Dans un modèle d'évaluation du risque dans les fruits de mer, Summers et Ross (2002) attribuèrent des facteurs de risque de 0 (aucun risque) à 100 (risque maximal) avec 25 à 28 pour *C. botulinum*, de 39-45 pour *L. monocytogenes*, de 37 pour *V. parahemolyticus*, de 37 pour *V. cholerae*, de 41 pour *V. vulnificus*, de 67 pour les virus, de 31 à 72 pour les biotoxines et de 31 à 48 pour les bactéries entériques. Bien qu'il s'agisse d'une étude australienne, elle reflète assez bien les données de la littérature mondiale. Ainsi, on voit que les mollusques bivalves sont une source multiple de danger. Il s'agit aussi bien de risques microbiologiques: bactéries et virus pathogènes que de risques toxicologiques. La norme européenne 91/492/EC garantit une certaine sécurité pour le consommateur. Cependant, elle ne tient pas compte de la détection des virus. Cependant, les nouvelles techniques de détection, notamment par PCR en transcription inverse devrait permettre de développer des tests faibles de détection des virus dans les mollusques. Cependant, pour garantir la sécurité d'un lot de mollusques, il faut réaliser des tests bactériologiques, des tests toxicologiques et des tests virologiques. Ceci signifie que le coût est important. Il serait donc intéressant de pouvoir disposer d'outils diagnostiques performants et peu coûteux.

Shellfish, a dangerous food ?

SUMMARY

Sea products are consumed worldwide. Seafood, especially shellfish, is consumed crude or not well cooked therefore they are risky for the development of foodborne diseases. Moreover, these animals filter water and

concentrate the microorganisms and the toxins. Risks are multiple : bacteria (*Clostridium*, *Vibrio*), viruses (norovirus, hepatitis A) and the biotoxins (paralytic, neurotoxic, diarrhoeic and amnesic) produced by phytoplankton. The European regulation 91/492/EC indicates the microbiological and toxicological criteria for the sale of the shell-

fish. Nevertheless, in the absence of good diagnosis methods, the viruses were omitted in this regulation. But it is a major cause of toxic-infection due to shellfish consumption. The large number of outbreaks worldwide due to the ingestion of seafood indicates that these ones must be carefully controlled. Therefore, we need power-

ful diagnosis tools. The aim of this review is to describe the major biological risks (bacteria, viruses, biotoxins) for the human health linked to the consumption of sea food.

BIBLIOGRAPHIE

- ASSOCIATION FRANCAISE DE NORMALISATION. Norme française NF V 08-060, microbiologie des aliments, dénombrement des coliformes thermotolérants par comptage des colonies obtenues à 44°C. In: Association Française de Normalisation (Ed.), microbiologie alimentaire, Tome 2: méthodes de routine et évaluation d'une méthode alternative. Association Française de Normalisation: Paris, 2002, 155-164.
- ARAUJO R. M., PUIG A., LASOBRAS J., LUCENA F., JOFRE J. Phages of enteric bacteria in fresh water with different levels of faecal pollution. *J. Appl. Microbiol.*, 1997, **82**, 281-6
- AUSTRALIA NEW ZEALAND FOOD AUTHORITY. Shellfish toxins in food. A toxicological review and risk assesment. Technical report series n°14. ANZFA: Canberra, Australie, 2001, 21 p.
- BAG P.K., NANDI S., BHACRA R. K., RAMAMURTHY T., BHATTACHARYA S. K., NISHIBUCHI M.; HAMABATA T., YAMASAKI S., TAEKEDA Y., NAIR G. B. Clonal diversity among recently emerged strains of *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 associated with pandemic spread. *J. Clin. Microbiol.*, 1999, **37**, 2354-2357.
- BRITISH BROADCAST CORPORATION. Vomiting bug cases at record high. BBC news. [en ligne] (3 January 2003). <http://news.bbc.co.uk/2/hi/health/2625509.stm> Consulté le 17/11/03.
- BRYNESTAD S., GRANUM PE. *Clostridium perfringens* and foodborne infections. *Int. J. Food Microbiol.*, 2002, **74**, 195-202.
- CANARD B., COLE S.T. Genome organization of the anaerobic pathogen *Clostridium perfringens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, **86**, 6676-6680
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. *Vibrio vulnificus* infections associated with eating raw oysters-Los Angeles, 1996. *MMWR*, 1996, **45**, 621-624
- CHOWDHURY N. R., CHAKRABORTY S ; RAMAMURTHY T., NISHIBUCHI M., YAMASAKI S., TAKEDA Y., NAIR G. B. Molecular evidence of clonal *Vibrio parahaemolyticus* pandemic strains. *Emerg. Infect. Dis.*, 2000, **6**, 631-636.
- COMMUNAUTE EUROPEENNE. Directive du conseil fixant les règles sanitaires régissant la production et la mise sur le marché de mollusques bivalves vivants (91/492/CEE). *J. Off. Comm. Europ.*, 1991, **L268**, 1-17.
- COMMUNAUTE EUROPEENNE. 1999/313/CE: décision du conseil; du 29 avril 1999, relative aux laboratoires de référence pour le contrôle des contaminations bactériologiques et virales des mollusques bivalves. *J. Off. Comm. Europ.*, 1999, **L120**, 40-41.
- CORNILLOT E., SAINT-JOANIS B., DAUBE G., KATAYAMA S.-I., GRANUM P.E., CANARD B., COLE S.T. The enterotoxin gene (*cpe*) of *Clostridium perfringens* can be chromosomal or plasmid-borne. *Mol. Microbiol.*, 1995, **15**, 639-647
- DE SCHRIJVER K., MAES I., DE MAN L., MICHELET J. Une épidémie d'intoxications diarrhéiques dues aux fruits de mer à Anvers, Belgique. *Eurosurveillance*, 2002, **7**, 139-141.
- DEVI S. J., HAYAT U., FRASCH C. E., KREGER A. S., MORRIS J.G. JR. Capsular polysaccharide-protein conjugate vaccines of carbo type 1 *Vibrio vulnificus*: construction, immunogenicity, and protective efficacy in a murine model. *Infect Immun.*, 1995, **63**, 2906-2911
- ELLIOT E. L., KVENBERG, J.E. Risk assesment used to evaluate the US position on *Listeria monocytogenes* in seafood. *Internat. J. Food Microbiol.*, 2000, **62**, 253-260.
- GALLACHER, S., SMITH E.A. Bacteria and Paralytic Sheelfish toxins. *Protist*, 1999, **150**, 245-255.
- GANTZER C., MAUL A., AUDIC J. M., SCHWARTZBROD L. Detection of infectious enteroviruses, enterovirus genomes, somatic coliphages, and *Bacteroides fragilis* phages in treated wastewater. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998, **64**, 4307-12.
- GLASS R.I., NOEL J., ANDO T., FANKHAUSER R., BELLIO G., MOUNTS A., PARASHAR U. D., BRESSEE J.S., MONROE S.S. The epidemiology of enteric caliciviruses from humans: a reassessment using new diagnostics. *J. Infect. Dis.*, 2000, **181**, S254-261.
- GRABOW W.O.K, NEUBRECH T.E., HOLTZHAUSEN C.S. JOFRE J. *Bacteroides fragilis* and *Escherichia coli* bacteriophages: excretion by humans and animals. *Wat. Sc. Technol.*, 1995, **31**, 223-230.

- HACKNEY C. R., DICHARRY A. Seafood borne bacterial pathogens of marine origin. *Food Technol.*, 1988, **42**, 104-109.
- HAEGHEBAERT S., POPOFF M. R., CARLIER J. P., PAVILLON G., DELAROCQUE-ASTAGNEAU E. Caractéristiques épidémiologiques du botulisme humain en France 1991-2000. [en ligne] (2003) Adresse URL : <http://www.invs.sante.fr/publications/2003/snmi/SNMI-G-p123-196.pdf> Consulté le 17/11/03
- HATHEWAY C. L. Botulism: the present status of the disease. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 1995, **195**, 55-75.
- HAVELAAR AH, HOGEBOOM WM. A method for the enumeration of male-specific bacteriophages in sewage. *J. Appl. Bacteriol.*, 1984, **56**, 439-47.
- HAVELAAR A. H., HOGEBOOM W. M. Factors affecting the enumeration of coliphages in sewage and sewage-polluted waters. *Ant. Van Leeuw.*, 1983, **49**, 387-397.
- HLADY W. G., MULLEN R. C., HOPKIN R. S. *Vibrio vulnificus* from raw oysters. Leading cause of reported deaths from foodborne illness in Florida. *J. Flo. Med. Assoc.*, 1993 **80**, 536-538.
- HOLMES M.J., TEO S. L. M. Toxic marine dinoflagellates in singapore waters that cause seafood poisonings. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 2002, **29**, 829-836.
- HONDA T., IIDA T. The pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* and the role of the thermostable direct hemolysin and related hemolysin. *Rev. Med. Microbiol.*, 1993, **4**, 106-113.
- HONDA T., NI Y. X., MIWATANI T. Purification and characterization of a hemolysin produced by a clinical isolate of Kanagawa phenomenon-negative *Vibrio parahaemolyticus* and related to the thermostable direct hemolysin. *Infect. Immun.*, 1988, **56**, 961-965.
- HYTTIÄ-TREES, E. Prevalence, molecular epidemiology and growth of *Clostridium botulinum* type E in fish and fishery products. (PhD thesis). University of Helsinki: Helsinki, 1999, 73 p.
- INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOOD. Fish and fish products. In: Bloom, R. (Ed.), microorganisms in foods, 6, microbial ecology of food commodities. Aspen Publication: Gaithersburg, 2000, 131-187.
- IGUCHI T, KONDO S, HISATSUNE K. *Vibrio parahaemolyticus* O serotypes from O1 to O13 all produce R-type lipopolysaccharide: SDS-PAGE and compositional sugar analysis. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1995, **130**, 287-292
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. Qualité de l'eau : détection et dénombrement des bactériophages Partie 1: dénombrement des bactériophages ARN F spécifiques. ISO 1075-1., ISO, Genève, Suisse, 1995, 1-12
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. Qualité de l'eau: détection et dénombrement des bactériophages Partie 2: énumération des coliphages somatiques. ISO 1075-2, ISO, Genève, Suisse, 1996, 1-15.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. Qualité de l'eau: détection et dénombrement des bactériophages — Partie 4: dénombrement des bactériophages infectant *Bacteroides fragilis*, ISO 10705-4, ISO, Genève, Suisse, 2001, 1-20
- JACKSON J. K., MURPHREE R. L., TAMPLIN M. L. Evidence that mortality from *Vibrio vulnificus* infection results from single strains among heterogeneous populations in shellfish. *J Clin Microbiol.*, 1997, **35**, 2098-2101
- JOSEPH S. W., COLWELL R. R., KAPER J. B. *Vibrio parahaemolyticus* and related halophilic Vibrios. *Crit. Rev. Microbiol.*, 1982, **10**, 77-124.
- KATAYAMA S., DUPUY B., DAUBE G., CHINA B., COLE S.T. Genome mapping of *Clostridium perfringens* strains with I-CeuI shows many virulence genes to be plasmid-borne. *Mol. Gen. Genet.*, 1996, **251**, 720-726.
- KINGSLEY D. H., RICHARDS G. P. Persistence of hepatitis A virus in oysters. *J. Food Prot.*, 2003, **66**, 331-334.
- KOOPMANS M., von BONSDORFF C.H., VINJE J., DE MEDICI D., MONROE S. Foodborne viruses. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2002, **26**, 187-205.
- LABBE R.G. *Clostridium perfringens*. In: Lind, B., Baird-Parker, T., Gould, G. (eds), The microbiological safety and quality of food. Aspen Publishers: Gaithersburg, 2000, 1110-1135.
- LECLERC H., EDBERG S., PIERZO V., DELATTRE J.M. Bacteriophages as indicators of enteric viruses and public health risk in groundwaters. *J. Appl. Microbiol.*, 2000, **88**, 5-21.
- LEE C. Y., PANICKER G., BEJ A. K. Detection of pathogenic bacteria in shellfish using multiplex PCR followed by CovaLink NH microwell plate sandwich hybridization. *J. Microbiol. Meth.*, 2003, **53**, 199-209
- LEMOINE T., GERMANETTO P., GIRAUD P. Toxi-infection alimentaire collective a *Vibrio parahaemolyticus*. [en ligne] (26/04/1999) Adresse URL : <http://www.invs.sante.fr/beh/1999/9910> Consulté le 21/11/03
- LOPALCO P.L., MALFAIT P., SALMASO S., GERMINARIO C., QUARTO M., BARBUTIL S. Une épidémie d'hépatite A persistante en Italie dans les Pouilles, 1996: suivi épidémiologique. *Eurosurveillance*, 1997, **2**, 31-33.
- LUIZZI G. D., SALLABANDA A., DIBRA A., KACARICY E., SHAPO L. Choléra dans la région méditerranéenne: une épidémie en Albanie. *Eurosurveillance*, 1995, **0**, 1-2.
- MATSUMOTO C., OKUDA J., ISHIBASHI M., IWANAGA M., GARG P., RAMMAMURTHY T., WONG H. C., DEPAOLA A., KIM Y. B., ALBERT M. J., NISHIBUCHI M. Pandemic spread of an O3 :K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* and emergence of related strains evidenced by arbitrarily primed PCR and *toxRS* sequences analyses. *J. Clin. Microbiol.*, 2000, **38**, 578-585.
- MIYOSHI S., OH E. G., HIRATA K., SHINODA S. Exocellular toxic factors produced by *Vibrio vulnificus*. *J. Toxicol.-Toxin Rev.*, 1993, **12**, 253-288.
- MUNIAIN-MUJICA I., CALVO M., LUCENA F., GIRONES R. Comparative analysis of viral pathogens

- and potential indicators in shellfish. *Intern. J. Food Microbiol.*, 2003, **83**, 75-85.
- NISHIBUCHI M., KAPER J. B. Thermostable direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus*: a virulence gene acquired by a marine bacterium. *Infect. Immun.*, 1995, **63**, 2093-9.
- OKUDA J., ISHIBASHI M., HAYAKAWA E., NISHINO T., TAKEDA Y., MUKHOPADHYAY A. K., GARG S., BHATTACHARYA SK, NAIR GB, NISHIBUCHI M. Emergence of a unique O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* in Calcutta, India, and isolation of strains from the same clonal group from Southeast Asian travelers arriving in Japan. *J. Clin. Microbiol.*, 1997, **35**, 3150-3155.
- OKUJO N., AKIYAMA T., MIYOSHI S., SHINODA S., YAMAMOTO S. Involvement of vulnibactin and exocellular protease in utilization of transferrin- and lactoferrin-bound iron by *Vibrio vulnificus*. *Microbiol Immunol.*, 1996, **40**, 595-598
- OLIVER J.D., KAPER J. B. *Vibrio* species. In: Doyle M. P., Beucat L. R., Montville, T.J. (Eds.), *Food microbiology*. ASM Press: Washington, 1997, 228-264.
- PETERSON K. M., MEKALANOS J. J. Characterization of the *Vibrio cholerae* *toxR* regulon: identification of novel genes involved in intestinal colonization. *Infect. Immun.*, 1988, **56**, 288-289.
- PETERSON K.M. Molecular pathogenesis of *Vibrio* Infections. In: Cary J.W., Linz J.E., Bhatnagar D. (Eds), *Microbial foodborne diseases, mechanisms of pathogenesis and toxin synthesis*. Technomic publishing Co: Lancaster, 2000, 157-185.
- PETIT L., GIBERT M., POPOFF M. R. *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype. *Trends Microbiol.*, 1999, **7**, 104-110.
- POTASMAN I., PAZ A., ODEH M. Infectious outbreaks associated with bivalve shellfish consumption: a worldwide perspective. *Clin. Infect. Dis.*, 2002, **35**, 921-928.
- QUILLIAM M. A. Phycotoxins. *J. AOAC Int.*, 1999, **82**, 773-81
- RAIMONDI F., KAO J. P., KAPER J. B., GUANDALINI S., FASANO A. Calcium-dependent intestinal chloride secretion by *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin in a rabbit model. *Gastroenterology.*, 1995, **109**, 381-386
- RAIMONDI F., KAO J.P.Y., FIORENTINI C., FABBRI A., DONELLI G., GASPARINI N., RUBINO A., FASANO A. Enterotoxicity and cytotoxicity of *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin in *in vitro* systems. *Infect. Immun.*, 2000, **68**, 3180-3185.
- ROBINSON E., WILES K.G., SCHWARZ J. R. *Vibrio vulnificus* infections: Texas 2000. *Dis. Prevent. News*, 2000, **60**, 1-4.
- ROCOURT, J., JACQUET CH., REILLY, A. Epidemiology of human listeriosis and seafoods. *Int. J. Food Microbiol.*, 2000, **62**, 197-209.
- RONVEAUX O., VOS D., BOSMAN A., BRANDWIJK K., VINJE K., KOOPMANS M., REINTJES R. Epidémie de gastroentérite à virus de Norwalk-like dans un hôpital de long et moyen séjour à Rotterdam. *Eurosurveillance.*, 2000, **5**, 54-57.
- SANCHEZ, G., PINTO, R. M., VANACLOCHA, H., BOSCH, A. Molecular characterization of hepatitis A virus isolates from a transcontinental shellfish-borne outbreak. *J. Clin. Microbiol.*, 2002, **40**, 4148-4155.
- SANTE CANADA. Direction générale de la population et de la santé publique. Fiche technique santé-sécurité-matière infectieuse, fiche n°75, le virus de l'Hépatite A. [en ligne] (2001). Adresse URL : <http://www.hc-sc.gc.ca/pphb-dgsp/msds-ftss/msds75e.html> Consulté le 17/11/03.
- SCIPIONI A., DAUBE G., THIRY E. La contamination de l'eau et des aliments par les virus pathogènes pour l'homme. *Ann. Méd. Vét.*, 2000, **144**, 207-211.
- SMITH DEWAAL C., BARLOW K, ALDERTON L., JACOBSON M. F. Outbreak alert !: Center for Sciences in Public Interest (CSPI) : Washington, 2001, 48 p.
- SUMMER J., ROSS T. A semi-quantitative seafood safety risk assesement. *Int. J. Food Microbiol.*, 2002, **77**, 55-59.
- TARTERA C., LUCENA F., JOFRE J. Human origin of *Bacteroides fragilis* bacteriophages present in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1989, **55**, 2696-2701.
- TRUCKSIS M., GALEN J. E., MICHALSKI J., FASANO A., KAPER J. B. Accessory cholera enterotoxin (Ace), the third toxin of a *Vibrio cholerae* virulence cassette. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, **90**, 5267-5271.
- WALDOR M.K., MEKALANOS J. J. Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. *Nature*, 1996, **272**, 1910-1914.
- WERKER D. H., KING A. S., KELLY M. T., MATHESON T. Le choléra en Colombie britannique. *RMTC*, 1996, **22**, 75-78
- WONG H. C., LIN C. H. Evaluation of typing of *Vibrio parahaemolyticus* by three PCR methods using specific primers. *J. Clin. Microbiol.*, 2001, **39**, 4233-4240.
- WORM H. C., Van Der POEL W. H. M., BRANDSTATTER G. Hepatitis E : an overview. *Microb. Infect.*, 2002, **4**, 657-666.