

Étude de la prévalence des *Vibrions Spp* dans les produits de la pêche au Maroc

Naima BOU M'HANDI* et Said HANOUNE

Centre Spécialisé de Valorisation et de Technologie des Produits de la Mer, Institut National de Recherche Halieutique, BP 1050 Poste principale, Agadir, Maroc

* Correspondance, courriel : nboumhandi@yahoo.fr

Résumé

37 échantillons de poisson constitués de crevette rose (n=18) et de sardine (n=19) sont étudiés en vue d'évaluer l'incidence de la contamination des produits de la pêche par *Vibrions spp*. Les résultats obtenus montrent une prévalence globale du genre *Vibrio* de 81% dans l'ensemble des produits de la pêche analysés. Cette prévalence est plus importante dans les produits à risque (crustacés) avec une fréquence d'isolement de 83,3% contre 78,9% dans le poisson. Les résultats obtenus montrent également une prédominance de *V. alginolyticus* 78,3% dans l'ensemble des produits analysés.

Mots-clés : *Vibrions, incidence, produits de la pêche, Maroc.*

Abstract

Study of the prevalence of *Vibrio Spp* in fishery products in Morocco

37 fish samples consisting of pink shrimp (n = 18) and sardine (n = 19) were studied to assess the incidence of contamination of fishery products by *Vibrio spp*. The results show an overall prevalence of *Vibrio* 81% in all fishery products analyzed. This prevalence is higher in risk products (Crustaceans) with a frequency of isolation of 83.3% against 78.9% in fish. The results also show a predominance of *V. alginolyticus* 78.3% in all products analyzed.

Keywords : *Vibrio spp, incidence, sea products, Morocco.*

1. Introduction

Les bactéries appartenant au genre *Vibrio* sont considérées comme natives des écosystèmes aquatiques marins et estuariens. Comme conséquence, la contamination naturelle des produits de la pêche est communément admise. Avant la commercialisation, cette contamination initiale peut être amplifiée pendant le stockage, si les bonnes conditions de conservation ne sont pas mises en place. Plus de 10 espèces de *Vibrio* connues provoquent des maladies humaines. Selon les espèces de *Vibrio* impliquées, les manifestations cliniques sont différentes, elles s'étendent des gastroentérites aux septicémies et les blessures de la plaie [1-3].

L'incidence des infections aux vibrions pathogènes est en constante et régulière progression dans le monde [4-6]. Cette progression pourrait être directement liée à l'augmentation de la concentration de ces bactéries dans les eaux côtières et estuariennes et qui est consécutive à l'anthropisation du littoral et au réchauffement planétaire. La consommation des produits de la mer et notamment des produits crus, ainsi que la mondialisation des échanges commerciaux des produits alimentaires pourraient contribuer, de façon substantielle, aux infections dues à ces germes pathogènes [7-9]. A côté de l'intérêt sanitaire, une prévalence élevée des vibrions pathogènes dans les produits de la mer peut constituer un frein dans le commerce international, ce qui peut créer des obstacles pour le Maroc qui a axé son plan économique sur le développement du secteur halieutique. En effet, ce secteur vient au premier rang des autres secteurs économiques du Maroc et constitue un patrimoine fertile en plein essor. Avec un chiffre d'affaires national à l'export dépassant les 13 milliards de dirhams, ce secteur occupe une place de choix dans l'économie du Maroc par les apports en devises qu'il réalise en matière d'exportation [10].

Par ailleurs, peu d'études ont été réalisées dans notre pays afin de mieux estimer la prévalence des vibrions pathogènes dans les produits de la pêche. De telles études sont importantes parce qu'elles permettent d'évaluer le risque dû à ces pathogènes notamment dans les étapes de la caractérisation du danger et de l'exposition aux risques. L'évaluation des risques dus à ces agents pathogènes est en mesure de contribuer à la mise en place des mesures préventives pour la maîtrise des dangers sanitaires liés à la consommation des produits de la pêche. C'est dans ce sens que s'inscrit la présente étude qui se fixe comme objectifs (i) l'évaluation de la qualité hygiénique des produits de la pêche au moment du débarquement au port d'Agadir, (ii) la distribution des différentes espèces de *Vibrio* en fonction des produits de la pêche analysés et (iii) la caractérisation des souches de *Vibrio* appartenant aux deux espèces le plus souvent impliquées en pathologie humaine par voie alimentaire, *V. cholerae* et *V. parahaemolyticus*.

2. Matériel et méthodes

2-1. Echantillonnage

37 échantillons de poisson constitués de crevette rose ($n = 18$) et de sardine ($n = 19$), débarqués au port d'Agadir, ont été collectés de façon aléatoire et simple, sur une période de 2 ans depuis janvier 2007. La fréquence d'échantillonnage était mensuelle. Des échantillons de cinq unités sont prélevés et placés dans des sachets stériles. Ces prélèvements sont ensuite transportés au laboratoire dans une glacière isotherme, et analysés dans les deux heures qui suivent le prélèvement.

2-2. Analyses bactériologiques

Nous avons adopté comme protocole d'analyse un protocole provisoire, rédigé en collaboration entre l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA) de Boulogne-sur-mer, l'Ecole Nationale de la Santé Publique (ENSP) à Rennes et le Centre National de Référence des vibrions et du Choléra (CNRVC) à l'Institut Pasteur à Paris. Ce protocole avait été rédigé à la demande de la Direction Générale de l'Alimentation, en France, dans le but de normaliser les protocoles d'étude et de recherche de *V. cholerae* et *V. parahaemolyticus* dans les produits de la mer entre les différents laboratoires vétérinaires de contrôle, dans l'attente de la publication d'une norme ISO pour la recherche des *Vibrio spp.* présumés pathogènes par voie digestive. L'essai est réalisé à partir de 25 g d'échantillons prélevés aseptiquement et dilués dans 225 ml d'eau peptonée alcaline à 2 % de NaCl, puis incubés 24 h à 41°C. A partir du bouillon d'enrichissement, un isolement sur milieu Thiosulfate Citrate Bile Salt (TCBS) (Oxoid LTD, Basingstoke, England) est effectué.

Après 24 h d'incubation à 37°C, 5 colonies saccharose positives (colonies jaunes sur milieu TCBS) et 5 colonies saccharose négatives (colonies bleu/vert sur milieu TCBS) ont été ré-isolées sur gélose nutritive à 2 % de NaCl (GNA) (BIORAD, Marnes la Coquette, France), puis incubées 18 à 24 h à 37 °C.

3. Résultats et discussion

Les résultats des identifications biochimiques des souches de vibrions isolées lors de cette étude sont résumés dans le **Tableau 1**. Les résultats de l'incidence des vibrions dans les différents produits de la pêche analysés sont résumés dans le **Tableau 2**. Cette étude a montré une prévalence globale du genre *Vibrio* de 81% dans l'ensemble des produits de la pêche analysés. Cette prévalence est plus importante dans les produits à risque (crustacés) avec une fréquence d'isolement de 83,3% contre 78,9% dans le poisson (sardine). A titre de comparaison, la fréquence d'isolement des espèces de *vibrio* à partir des crustacés est de 80% au Mexique, 40% en Equateur et 70% en Chine [11], 46-76% en Taïwan à partir de crabes et crevettes importés de Vietnam, Hong Kong et Thaïlande [12]. Des études ont montré que les espèces du genre *Vibrio* sont capables de produire une chitinase si bien que le nombre de *Vibrio* augmente lorsque les organismes marins présentent de la chitine. Les crevettes, crabes et copépodes seraient des porteurs potentiels de *Vibrio*. La capacité des *Vibrions* à s'attacher à la carapace chitineuse des crustacés a été étudiée [13]. Une fois que les cellules de *Vibrio* ont atteint la carapace, elles s'y attachent grâce à des interactions ioniques et des adhésines. Cette caractéristique assure à la bactérie sa persistance dans le milieu marin et peut favoriser sa transmission aux humains.

Tableau 1 : Résultats de l'identification biochimique des souches de vibrions isolées des produits de la pêche

Souche N°	Origine écologique	Identification biochimique	Croissance en cc de NaCl	Résultats des Identification
1	sardine	<i>V. alginolyticus</i>	3 à 10%	<i>V. alginolyticus</i>
2	sardine	<i>V. alginolyticus</i>	3 à 10%	<i>V. alginolyticus</i>
3	sardine	<i>V. alginolyticus</i>	3 à 10%	<i>V. alginolyticus</i>
4	crevette	<i>V. alginolyticus</i>	3 à 10%	<i>V. alginolyticus</i>
5	crevette	<i>V. alginolyticus</i>	3 à 10%	<i>V. alginolyticus</i>
6	sardine	<i>V. alginolyticus</i>	3 à 10%	<i>V. alginolyticus</i>
7	sardine	<i>V. alginolyticus</i>	3 à 10%	<i>V. alginolyticus</i>
8	crevette	<i>V. alginolyticus</i>	3 à 10%	<i>V. alginolyticus</i>
9	crevette	<i>V. alginolyticus</i>	3 à 10%	<i>V. alginolyticus</i>
10	crevette	<i>V. alginolyticus</i>	3 à 10%	<i>V. alginolyticus</i>
11	crevette	<i>V. alginolyticus</i>	3 à 10%	<i>V. alginolyticus</i>
12	sardine	<i>V. alginolyticus</i>	3 à 10%	<i>V. alginolyticus</i>
13	sardine	<i>V. alginolyticus</i>	3 à 10%	<i>V. alginolyticus</i>
14	sardine	<i>V. alginolyticus</i>	3 à 10%	<i>V. alginolyticus</i>
15	crevette	<i>V. alginolyticus</i>	3 à 10%	<i>V. alginolyticus</i>
16	sardine	<i>V. vulnificus</i>	3 à 6%	<i>V. vulnificus</i>
17	crevette	<i>V. alginolyticus</i>	3 à 10%	<i>V. alginolyticus</i>
18	crevette	<i>V. alginolyticus</i>	3 à 10%	<i>V. alginolyticus</i>
19	sardine	<i>V. alginolyticus</i>	3 à 10%	<i>V. alginolyticus</i>

20	sardine	<i>V. alginolyticus</i>	3 à 10%	<i>V. alginolyticus</i>
21	sardine	<i>V. alginolyticus</i>	3 à 10%	<i>V. alginolyticus</i>
22	sardine	<i>V. alginolyticus</i>	3 à 10%	<i>V. alginolyticus</i>
23	sardine	<i>V. alginolyticus</i>	3 à 10%	<i>V. alginolyticus</i>
24	sardine	<i>V. alginolyticus</i>	3 à 10%	<i>V. alginolyticus</i>
25	crevette	<i>V. alginolyticus</i>	3 à 10%	<i>V. alginolyticus</i>
26	sardine	<i>V. alginolyticus</i>	3 à 10%	<i>V. alginolyticus</i>
27	sardine	<i>V. alginolyticus</i>	3 à 10%	<i>V. alginolyticus</i>
28	sardine	<i>V. alginolyticus</i>	3 à 10%	<i>V. alginolyticus</i>
29	crevette	<i>V. alginolyticus</i>	3 à 10%	<i>V. alginolyticus</i>
30	crevette	<i>V. alginolyticus</i>	3 à 10%	<i>V. alginolyticus</i>
31	sardine	<i>V. alginolyticus</i>	3 à 10%	<i>V. alginolyticus</i>
32	crevette	<i>V. alginolyticus</i>	3 à 10%	<i>V. alginolyticus</i>
33	crevette	<i>V. alginolyticus</i>	3 à 10%	<i>V. alginolyticus</i>
34	crevette	<i>V. alginolyticus</i>	3 à 10%	<i>V. alginolyticus</i>
35	sardine	<i>V. alginolyticus</i>	3 à 10%	<i>V. alginolyticus</i>
36	sardine	<i>V. alginolyticus</i>	3 à 10%	<i>V. alginolyticus</i>
37	crevette	<i>V. alginolyticus</i>	3 à 10%	<i>V. alginolyticus</i>
38	crevette	<i>V. alginolyticus</i>	3 à 10%	<i>V. alginolyticus</i>
39	crevette	<i>V. alginolyticus</i>	3 à 10%	<i>V. alginolyticus</i>
40	sardine	<i>V. alginolyticus</i>	3 à 10%	<i>V. alginolyticus</i>
41	sardine	<i>V. alginolyticus</i>	3 à 10%	<i>V. alginolyticus</i>
42	crevette	<i>V. alginolyticus</i>	3 à 10%	<i>V. alginolyticus</i>
43	crevette	<i>V. alginolyticus</i>	3 à 10%	<i>V. alginolyticus</i>
44	sardine	<i>V. alginolyticus</i>	3 à 10%	<i>V. alginolyticus</i>
45	crevette	<i>V. alginolyticus</i>	3 à 10%	<i>V. alginolyticus</i>
46	sardine	<i>V. alginolyticus</i>	à 10%	<i>V. alginolyticus</i>
47	sardine	<i>V. alginolyticus</i>	3 à 10%	<i>V. alginolyticus</i>
48	crevette	<i>V. alginolyticus</i>	3 à 10%	<i>V. alginolyticus</i>
49	crevette	<i>V. alginolyticus</i>	3 à 10%	<i>V. alginolyticus</i>
50	sardine	<i>V. alginolyticus</i>	3 à 10%	<i>V. alginolyticus</i>
51	crevette	<i>V. alginolyticus</i>	3 à 10%	<i>V. alginolyticus</i>
52	crevette	<i>V. alginolyticus</i>	3 à 10%	<i>V. alginolyticus</i>

Les résultats obtenus de la présente étude montrent une prédominance de *V. alginolyticus*, 78,3% dans l'ensemble des produits de la pêche analysés dont 83,3% dans la crevette et 73,6% dans la sardine. Cette forte présence de *V. alginolyticus* dans les échantillons analysés, confirme l'appartenance de cette espèce à la flore native de l'environnement aquatique [14]. Par conséquent, elle représenterait une flore normale des produits de la pêche [15], mais cela n'exclurait en rien le risque lié à la consommation de ce type de produit. En effet, l'application de techniques moléculaires notamment de PCR à l'étude des souches identifiées biochimiquement comme *V. alginolyticus* a permis de mettre en évidence des souches de *V. parahaemolyticus* atypique pour le saccharose [16]. Des PCR spécifiques des espèces *V. cholerae* et *V. mimicus*, basées sur l'amplification de séquences de l'espace intergénique 16-23S, peuvent également être utilisées pour mettre en évidence des souches de *V. mimicus* atypiques pour le saccharose [7]. La spécificité et la sensibilité de la technique PCR, par rapport à la méthode conventionnelle de culture, pour la

détermination des vibrions pathogènes dans les produits de la pêche ont été rapportées par plusieurs travaux [17-20]. Par une technique PCR Multiplex, PANICKER et al. [19] ont rapporté une fréquence d'isolement des *Vibrio spp* dans les huîtres naturelles de 100% avec 83,3% de *V. parahaemolyticus* dont 13 à 20% sont des souches pathogènes qui possèdent soit le gène TDH, le gène TRH ou les deux.

Tableau 2 : Incidence des vibrions dans différents produits de la pêche analysés

Nature du produit de pêche	Nombre d'échantillons testés	Vibrions isolés Nombre (pourcentage)		
		<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. vulnificus</i>	<i>V. spp</i>
Sardine	19	14 (73,6)	1 (5,2)	15 (78,9)
Crevette	18	15 (83,3)	0 (0)	15 (83,3)
Total des produits	37	29 (78,3)	1 (2,7)	30 (81)

La prévalence de l'espèce *V. parahaemolyticus* est en étroite relation avec la température de l'eau. En effet, cette espèce a été souvent isolée d'échantillons de l'environnement aquatique quand la température de l'eau de mer dépasse 20°C [8, 21-22]. Par contre, sa faible incidence a été rapportée notamment dans les eaux côtières tempérées et pendant les mois les plus froids [23]. Sur des échantillons de l'environnement prélevés dans la lagune de Oualidia entre les mois de novembre et mai, son absence a été signalée par BOUCHRITI et EL MARRAKCHI [24]. Ces données sont en parfaite concordance avec nos résultats qui montrent l'absence de *V. parahaemolyticus* dans les échantillons étudiés. Il a été décrit de rares souches de *V. cholerae* n'appartenant pas aux sérogroupes 01 ou 0139 (*V. cholerae non-01/non0139*) possédant les gènes de la toxine cholérique, ce qui explique que ces gènes soient systématiquement recherchés chez toutes les souches de *V. cholerae* isolées dans le cadre de contrôles de produits de la mer destinés à la consommation. Dans notre étude aucune souche de *V. cholerae* (*V. cholerae non 01/non 0139*) n'a été isolée à partir des échantillons étudiés. Ces résultats supportent l'étude qui a été effectuée en Iran et qui a montré l'absence de cette espèce dans les échantillons de crevettes prélevés du golf persique témoignant ainsi la bonne qualité de ces eaux [15].

Concernant *V. vulnificus*, il existe des variations phénotypiques considérables d'une souche à l'autre, y compris pour les fermentations du lactose et du saccharose qui sont considérées comme des caractères importants pour l'identification de l'espèce [25]. *V. vulnificus* est une espèce halophile, elle est distinguée de *V. parahaemolyticus* par sa capacité de produire ONPG et fermenter le lactose. Elle exige 0.5% de NaCl pour sa croissance et tolère 6% mais non 8% de NaCl [26]. Dans notre étude, nous n'avons isolé qu'une souche de *V. vulnificus* à partir de la sardine. *V. vulnificus* est rapporté par plusieurs études comme agent d'infection associé à l'ingestion des produits de la mer [27-28]. L'apparition de ces infections est hautement corrélée avec la température de l'eau de mer. En outre, il est reconnu que les densités de l'organisme augmentent pendant les mois chauds, une conclusion correspondant à la distribution saisonnière des cas [7, 28-29]. L'espèce *V. mimicus* est biochimiquement très proche de *V. cholerae* dont elle ne diffère que par la non fermentation du saccharose. L'identification de cette espèce suivie d'une PCR permet de vérifier s'il ne s'agit pas d'une souche de *V. cholerae* atypique [30]. Dans le cadre de notre étude aucune souche de *V. mimicus* n'a été décelée ce qui est en parfaite concordance avec les résultats obtenus sur les élevages de crevettes en Inde [31]. Une faible incidence de cette espèce a été rapportée dans l'étude réalisée par COHEN et al. [32] sur des échantillons de produits de la pêche commercialisés à Casablanca. La seule souche de *V. mimicus* isolée et confirmée par techniques biochimiques et moléculaires n'était pas porteuse de gènes codant pour la synthèse de la toxine cholérique.

Il est par ailleurs à noter que la présence des bactéries du genre *Vibrio* dépend de nombreux facteurs abiotiques incluant en plus de la fluctuation de la température, la quantité de matière organique et inorganique dans l'eau et les sédiments, le pH, la salinité, la variation de la pression en oxygène et l'exposition aux rayons ultraviolets du soleil. En outre, il n'est pas toujours facile de connaître la quantité de *Vibrio* présente dans l'environnement avec les méthodes de détection habituelles. En effet, les conditions environnementales imposent une variété de stress aux bactéries qui en retour ont développé différentes stratégies pour survivre. C'est pourquoi l'incidence d'une espèce dans l'environnement marin varie selon plusieurs facteurs écologiques. Dans les échantillons environnementaux, les *Vibrio* peuvent avoir subi différents stress physico-chimiques et donc ne pas pousser sur les milieux sélectifs et/ou non sélectifs. Dans des conditions environnementales défavorables, la formation de cellules viables mais non cultivables (VNC) a été démontrée, mais le rôle que de telles cellules peuvent jouer dans l'environnement et la pathogénèse est encore loin d'être connu. Les cellules VNC sont incapables de former des colonies par étalement sur gélose mais sont encore capables d'avoir une activité métabolique. De plus, elles restent potentiellement pathogènes et peuvent redevenir actives lorsque les conditions environnementales favorables sont restaurées [33-34].

4. Conclusion

L'étude de la prévalence des *Vibrions* pathogènes pour l'homme a été conduite dans 37 échantillons de produits de la pêche dont crevette (n= 18) et sardine (n= 19) débarqués au port d'Agadir. Au total, 118 isolats ont été isolés au cours de cette étude dont 52 sont suspectés appartenir au genre *Vibrio* sur la base des examens microscopiques et biochimiques, notamment le test de l'oxydase et la recherche de la lysine décarboxylase et l'arginine dihydrolase. Ainsi, l'utilisation du système d'identification API 20 E confronté à l'analyse de la galerie NaCl ont permis d'identifier 51 isolats de *V. alginolyticus* et 1 isolat de *V. vulnificus*. La forte présence de *V. alginolyticus* dans les échantillons analysés, confirme l'appartenance de cette espèce à la flore native de l'environnement aquatique. Par conséquent, elle représenterait une flore normale des produits de la pêche, mais cela n'exclurait en rien le risque lié à la consommation de ce type de produit. En effet, l'application de techniques moléculaires notamment de PCR à l'étude des souches identifiées biochimiquement comme *V. alginolyticus* permettent de mettre en évidence des souches de *V. parahaemolyticus* atypique pour le saccharose. Il est donc nécessaire, pour une meilleure prévention des infections alimentaires à *Vibrio*, d'améliorer les méthodes de détection et de caractérisation des espèces de *Vibrio* pathogènes pour l'homme. L'utilisation des réactions d'amplification génique (PCR) assure, non seulement une meilleure spécificité que les techniques bactériologiques classiques pour la détermination de l'espèce, mais permet également la mise en évidence des différents gènes de pathogénicité des deux espèces principalement associées au risque *Vibrio* dans les produits de la mer, *V. cholerae* et *V. parahaemolyticus*.

Références

- [1] - FAO/WHO.: Risk assessment of choleraenic *Vibrio cholerae* O1 and O139 in warm-water shrimp in international trade, 09(b) (2005) 86p- ISBN: 1726-5274,
- [2] - S. GOPAL, S.K. OTTA, I. KARUNASAGAR and H. NICHIBUCHI : The occurrence of *Vibrio* species in tropical shrimp culture environments; implications for food safety. *Int. J Food Microbiol.*, 102 (2005) 151-159,
- [3] - WHO.: Cholera response: Assessing the outbreak response and improving preparedness, (2004),
- [4] - FAO/WHO. : Food Safety Consultation, Risk assessment of *Campylobacter* spp. In broiler chickens and *Vibrio* spp. In seafood. *Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation* (Bangkok, Thailand), (2002) 59p,
- [5] - S.F. GONZALEZ, M.J. KRUG, M.E. NIELSEN, Y. SANTOS and D.R. CALL: Simultaneous detection of marine fish pathogens by using multiplex PCR and DNA Microarray. *J. Clin. Microbiol.*, 42 (2004) 1414-1419,
- [6] - Y. HARA-KUDO, K. SUGIYAMA, M. NISHIBUCHI, A. CHOWDHURY, J. YATSUYANAGI, Y. OHTOMO, A. SAITO, H. MAGNAGANO, T. NISHINA, H. NAKAGAWA, A. KONUMA, M. MIYAHARA and S. KUMAGAI: Prevalence of pandemic thermostable direct hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 in seafood and the coastal environment in Japan. *Appl. Env. Microbiol.*, 69 (2003) 3883-3891,
- [7] - EUROPEAN COMMISSION.: Opinion of the Scientific Committee on Veterinary Measures relating to Public Health on *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* in raw and undercooked seafood, (2011),
- [8] - FAO/WHO.: Risk assessment of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood, 16 (2011) 183p- ISBN : 978-92-5-106874-8,
- [9] - G. TANTILLO, M. FONTANAROSA, A. DI PINTO and M. MUSTI: Update perspectives on emerging *vibrios* associated with human infections. *Letters in Appl. Microbiol.*, 39 (2004) 117-126,
- [10] - ANONYME : Communiqué de presse du Département des Pêches Maritimes, paru dans *Aujourd'hui Le Maroc*, le 22/01/2009,
- [11] - N. BOUCHRITI, A. HAMOUDA, H. KARIB, B. OUMOKHTAR et I. YAAKOUBI: Appréciation de la qualité bactériologique des huîtres *Crassostrea gigas* commercialisées à Rabat. *Animalis*, 2 (2001) 26-35,
- [12] - H.C. WONG, M.C. CHEN, S.H. LIU and D.P. LIU: Incidence of highly genetically diversified *Vibrio parahaemolyticus* in seafood imported from Asian countries., *International Journal of Food Microbiology*, 52 (1999) 181-188,
- [13] - J. CASTRO-ROSAS and E.F. ESCARTIN: Adhesion and colonisation of *Vibrio cholerae* O1 on shrimp and crab carapaces. *Journal of Food Protection*, 65(3) (2002) 492-498,
- [14] - J.M. FOURNIER et M.L. QUILICI: Infections à *Vibrions* non cholériques. *Encycl. Méd. Chir. (ed.)*, Maladies infectieuses, 8 (026 F-15) (2002) 7p,
- [15] - H. HOSSEINI, A.M. CHERGHALI, R. YALFANI and V. RAZAVILAR: Incidence of *Vibrio* spp. in shrimp caught of the south coast of Iran. *Food Control*, 15 (2004) 187-190,
- [16] - A. ROBERT-PILLOT, A. GUENOLE and J.M. FOURNIER: Usefulness of R72H PCR assay for differentiation between *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* species: validation by DNA-DNA hybridization. *FEMS Microbiol. Lett.*, 215 (2002) 1-6,
- [17] - A.J. GUBALA and D.F. PROLL: Molecular-Beacon Multiplex Real-Time PCR assay for detection of *Vibrio cholerae*. *App. Env. Microbiol.*, 72 (2006) 6424-6428,
- [18] - C.Y. LEE, S.F. PAN and C.H. CHEN: Sequence of a cloned pR72H fragment and its use for detection of *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish with the PCR. *Appl. Env. Microbiol.*, 61 (1995) 1311-1317,
- [19] - G. PANICKER, D.R. CALL, M.J. KRUG and A.K. BEJ: Detection of pathogenic *Vibrio* spp. in shellfish by using multiplex PCR and DNA microarrays. *Appl. Env. Microbiol.*, 70 (2004) 7436-7444,

- [20] - C. TANXI, J. LUYAN, Y. CHENGBO and H. KEHE: Application of real-time PCR for quantitative detection of *Vibrio parahaemolyticus* from seafood in eastern China. *FEMS Imm. & Med Microbiol*, 46 (2006) 180-186,
- [21] - P. SALINA, A.H. KUMIDINI, C.B. JOHN, L.J. JESSICA, L.T. MARK, M. RUSTY, B. KATTY, V.D. LIGIA and D. ANGELO: Seasonal distribution of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay oysters and waters. *Int. J. of Food Microbiol.*, 128 (2008) 354-361,
- [22] - L.A. WILLIAMS and P.A. LAROCK: Temporal occurrence of *Vibrios* species and *Aeromonas hydrophila* in estuarine sediments. *Appl. and Env. Microbiol.*, 50(6) (1985) 1490-1495,
- [23] - M.A.R. CHOWBURY, H. YAMANAKA, S. MIYOSHI and S. SHINODA: Ecology and distribution of *Vibrio parahaemolyticus* in aquatic environments of a temperate region. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 74 (1990) 1-10,
- [24] - B. BOUCHRITI and A. EL MARRAKCHI: Occurrence of marine *Vibrios* in Moroccan coastal waters and shellfish. *Microbiol. Alim. Nut.*, 13 (1995) 381-387,
- [25] - J. LESNE and J.M. FOURNIER: *Vibrio*. In Manuel de Bactériologie Alimentaire. Polytechnica (Ed.), Paris (1998),
- [26] - J.C. MC LAUGHLIN: *Vibrio*. Manual of Clinical Microbiology. Ed P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Pfaller et R.H. Tenenbaum (1995),
- [27] - N. BISHARAT, V. AGMON, R. FINKELSTEIN, R. RAZ, G. BEN-DROR, L. LERNER, S. SOBOH, R. COLODNER, D.N. CAMERON, D.L. WYKSTRA, D.L. SWERDLOW and J.J. FARMER: Clinical, epidemiological, and microbiological features of *Vibrio vulnificus* biogroup 3 causing outbreaks of wound infection and bacteraemia in Israel. *Lancet*, 354 (1999) 1421-1424,
- [28] - FAO/WHO.: Risk assessment of *Vibrio vulnificus* in raw oysters, 08(a) (2005) 114 p.- ISBN: 925 105423 1,
- [29] - C.R. ARIAS, M.C. MACIAN, R. AZNAR, E. GARAY and M.J. PUJALTE: Low incidence of *Vibrio vulnificus* among *Vibrio* isolated from sea water and shellfish of the western Mediterranean coast. *J. Appl. Microbiol.*, 86 (1999) 125-134,
- [30] - J. CHUN, A. HUQ and R. COLWELL: Analysis of 16S-23S rRNA intergenic spacer regions of *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus*. *Appl. Env. Microbiol.*, 65 (1999) 2202-2208,
- [31] - N. BHASKAR, T.M.R. SETTY, S. MONDAL, M.A. JOSEPH, C.V. RAJU, B.S. RAGHUNATH and C.S. ANANTHA: Prevalence of bacteria of public health significance in the cultured shrimp (*Penaeus monodon*). *Food Microbiology*, 15 (1998) 511- 519,
- [32] - N. COHEN, H. KABIB, J. AIT SAID, L. LEMEE, A. GUENOLE et M.L. QUILICI: Prévalence des *vibriions* potentiellement pathogènes dans les produits de la pêche commercialisés à Casablanca (Maroc). *Rev. Med. Vét.*, 158 (2007) 562-568,
- [33] - M.J. ALAM, K.I. TOMOCHIKA, S.I. MIYOSHI and S. SHINODA: Environmental investigation of potentially pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in the Seto-Inland Sea, Japan., *FEMS Microbiology Letters*, 208 (2002) 83-87,
- [34] - J.D. OLIVER. The pathogenicity and ecology of *Vibrio vulnificus*. *Marine Techn. Soc. J.*, 15 (1981) 45-52.