



HAL
open science

Étude de la résistance aux antibiotiques de souches de *Vibrio parahaemolyticus* isolées de produits de la pêche

Nicolas Helsens

► **To cite this version:**

Nicolas Helsens. Étude de la résistance aux antibiotiques de souches de *Vibrio parahaemolyticus* isolées de produits de la pêche. Sciences du Vivant [q-bio]. 2018. dumas-02148585

HAL Id: dumas-02148585

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02148585>

Submitted on 5 Jun 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N° d'ordre :

ANNÉE 2018



THÈSE D'EXERCICE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire

Thèse en vue du
DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

présentée par

Nicolas Helsens

**Etude de la
résistance aux
antibiotiques de
souches de *Vibrio
parahaemolyticus*
isolées de produits
de la pêche**

**Thèse soutenue à Rennes
le 01/10/2018**

devant le jury composé de :

Anne GOUGEON-JOLIVET

Professeur, Université de Rennes 1/ Président /
Directeur de thèse

Pierre-Yves DONNIO

Professeur, Université de Rennes 1

Sandrine BARON

Chargée de projet scientifique, Anses/ examinatrice

ANNEE 2017-2018

Listes des enseignants-chercheurs de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

PROFESSEURS

		Pharmacien	HDR	Hospitalo-U
1	BOUSTIE Joël	X	HDR	
2	BURGOT Gwenola	X	HDR	X
3	DONNIO Pierre Yves	X	HDR	X
4	FAILI Ahmad		HDR	
5	FARDEL Olivier	X	HDR	X
6	FELDEN Brice	X	HDR	
7	GAMBAROTA Giulio		HDR	
8	GOUGEON Anne	X	HDR	
9	LAGENTE Vincent	X	HDR	
10	LE CORRE Pascal	X	HDR	X
11	LORANT (BOICHOT) Elisabeth		HDR	
12	MOREL Isabelle	X	HDR	X
13	SERGENT Odile	X	HDR	
14	SPARFEL-BERLIVET Lydie	X	HDR	
15	TOMASI Sophie	X	HDR	
16	URIAC Philippe	X	HDR	
17	VAN DE WEGHE Pierre		HDR	
18	VERNHET Laurent	X	HDR	

PROFESSEURS ASSOCIES

		Pharmacien	HDR	Hospitalo-U
1	BUREAU Loïc	X		
2	DAVOUST Noëlle	X		

PROFESSEURS EMERITES

		Pharmacien	HDR	Hospitalo-U
1	CILLARD Josiane	X	HDR	
2	GUILLOUZO André		HDR	

MAITRES DE CONFERENCES

			Pharmacien	HDR	Hospitalo-U
1	ABASQ-PAOFI	Marie-Laurence			
2	ANINAT	Caroline	X	HDR	
3	AUGAGNEUR	Yoann			
4	BEGRICHE	Karima			
5	BOUSARGHIN	Latifa		HDR	
6	BRANDHONNEUR	Nolwenn			
7	BRUYERE	Arnaud	X		
8	BUNETEL	Laurence	X		
9	CHOLLET-KRUGLER	Marylène	X		
10	COLLIN	Xavier	X		
11	CORBEL	Jean-Charles	X	HDR	
12	DAVID	Michèle	X	HDR	
13	DELALANDE	Olivier			
14	DEMAIL	David			
15	DION	Sarah			
16	DOLLO	Gilles	X	HDR	X
17	GICQUEL	Thomas	X		X
18	GILOT	David		HDR	
19	GOUAULT	Nicolas		HDR	
20	HITTI	Eric			
21	JEAN	Mickaël			
22	JOANNES	Audrey			
23	LEUREUR	Valérie		HDR	
24	LE FERREC	Eric	X		
25	LE GALL-DAVID	Sandrine			
26	LE PABIC	Hélène			
27	LEGOUIN-GARGADENNEC	Béatrice			
28	LOHEZIC-LE DEVEHAT	Françoise	X		
29	MARTIN-CHOULY	Corinne		HDR	
30	MINET	Jacques	X	HDR	
31	NOURY	Fanny			
32	PINEL-MARIE	Marie-Laure			
33	PODECHARD	Normand			
34	POTIN	Sophie	X		X
35	RENAULT	Jacques	X	HDR	
36	ROUILLON	Astrid			

ASSISTANT HOSPITALO-UNIVERSITAIRE (AHU)

			Pharmacien	HDR	Hospitalo-U
1	BACLE	Astrid	X		X
2	BOUVRY	Christelle	X		X

ATER

1	PALAZZO	Claudio			
2	VICTONI	Tatiana	X		

Remerciements

Je remercie très sincèrement :

Madame Anne JOLIVET-GOUGEON, Professeur à la Faculté de Pharmacie de Rennes, pour avoir accepté d'encadrer cette thèse. Je vous remercie pour vos remarques, pour votre bienveillance et votre indulgence, pour m'avoir aidé à conduire ces travaux dans les meilleures conditions. Je vous remercie tout particulièrement pour m'avoir ouvert au monde de la recherche et m'y avoir donné goût.

Madame Sandrine BARON, Chargée de Projets Scientifiques à l'Anses de Ploufragan-Plouzané et **Monsieur Pierre-Yves DONNIO**, Professeur à la Faculté de Pharmacie de Rennes, pour avoir accepté d'être membres de mon jury de thèse.

Madame Odile SERGENT, Professeur à la Faculté de Pharmacie de Rennes, pour m'avoir guidé dans la recherche depuis le début de mon projet, pour vos conseils, votre aide précieuse, vos remarques et vos remontrances toujours justifiées. L'étudiant naïf que j'étais vous doit de l'avoir ramené sur terre, le doctorant que je suis vous doit de l'avoir poussé jusqu'ici.

Madame Graziella MIDELET-BOURDIN, Directrice de Recherche à l'Anses de Boulogne-sur-Mer, pour avoir encadré la réalisation de ces travaux et pour m'avoir posé les bonnes questions sur mon projet professionnel. Je pense qu'un stagiaire ne peut s'épanouir que s'il est bien encadré, dans mon cas toutes les conditions étaient réunies pour que ce soit le cas. Je remercie également **Monsieur Arnaud BRIET**, Doctorant (encore un peu) à l'Anses de Boulogne-sur-Mer, même si c'est toi qui devrait me remercier d'avoir travaillé pour toi, pour ta présence, tes discussions scientifiques ou pas, et plus généralement pour avoir réussi à conserver mon envie de prendre le même chemin que toi.

D'une façon plus générale je remercie toute l'équipe du Laboratoire des Produits de la Pêche et de l'Aquaculture de l'Anses de Boulogne-sur-Mer pour leur présence, leur compétence et leur gentillesse, merci d'avoir rendu ce (trop court) passage si agréable.

Madame Isabelle MOREL bien évidemment, pour ses conseils, son soutien tout au long de

mon parcours, avant et, j'en suis convaincu, après.

Je remercie également toute ma famille, mes parents et mon frère, pour leur soutien, leur présence, leur tolérance dans les moments les plus durs, et leur indulgence. Je remercie tout spécialement mes tantes qui ont pris le temps de venir me supporter lors de ma remise de diplômes, pour leur soutien et leurs cadeaux si particuliers.

Je remercie très très très très chaleureusement mes amis pharmaciens, Arthur, Yanna, Cécile, Pauline et Margot, Marion, Isabelle, Guillaume et Matthieu, d'être là toujours et j'espère pour encore très longtemps, de me faire rire et même parfois de me trouver drôle, d'être des gens si géniaux et surtout d'être détraqués. Je vous aime.

Je remercie bien évidemment Marie-Caroline d'être là, de me soutenir, de m'encourager, de me motiver et de faire en sorte que tout aille si bien.

Pour finir je remercie tous les autres, tous ceux que je ne peux pas citer parce qu'il me faudrait 100 pages de plus, mes amis qui sont là depuis longtemps ou pas, mais qui sont bien là, ceux qui m'apprécient, ceux qui me font rire, ceux qui sont toujours partants, mes collègues, tous ceux qui m'ont à leur manière tous dirigé vers ce point. Merci à tous, je vous dois tout.

Et merci à Alain CHABAT d'être. Tout court.

Serment de Galien

Je jure, en présence des maîtres de la Faculté et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans

Les préceptes de mon art et de leur

Témoigner ma reconnaissance en

Restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé

Publique, ma profession avec

Conscience et de respecter non

Seulement la législation en

Vigueur, mais aussi les règles de

L'honneur, de la probité et du

Désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité

Et mes devoirs envers le malade

Et sa dignité humaine ; en aucun

Cas, je ne consentirai à utiliser

Mes connaissances et mon état pour

Corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur

Estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et

Méprisé de mes confrères si j'y manque

Table des matières

Remerciements	2
Table des matières	7
Liste des tableaux et figures	9
Liste des abréviations	10
Introduction	11
I. <i>Vibrio spp.</i>	12
a. Généralités	12
b. Réglementations	12
II. Prévalence et épidémiologie.....	13
a. <i>Vibrio cholerae</i>	13
b. <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	13
c. <i>Vibrio vulnificus</i>	15
III. Virulence et pathologie.....	15
a. <i>Vibrio cholerae</i>	15
b. <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	16
c. <i>Vibrio vulnificus</i>	17
IV. Méthodes d'identification.....	18
V. Résistance aux antibiotiques.....	20
a. Mécanismes de résistance.....	20
b. Techniques d'antibiogramme	21
c. Etude de l'antibiorésistance	22
d. Epidémiologie de la résistance aux antibiotiques chez <i>Vibrio</i>	23
VI. Traitements	26
a. <i>Vibrio cholerae</i>	26
b. <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	26
c. <i>Vibrio vulnificus</i>	26
VII. Présentation du sujet.....	27
Matériel et méthodes	28
I. Origine des souches	28
II. Identification biochimique (Galerie API 20 ^E)	29

III. Identification moléculaire.....	29
a. Extraction d'ADN.....	29
b. PCR de du gène 16S rRNA	30
c. PCR temps réel R72H.....	31
IV. Antibiogrammes	32
V. Traitement statistique des données des antibiogrammes	33
Résultats	34
I. Identification des souches bactériennes.....	34
II. Antibiogrammes des souches de <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	37
Discussion	43
Conclusion et perspectives	50
Valorisation.....	52

Liste des tableaux et figures

Tableau 1 : Epidémies dues à <i>Vibrio parahaemolyticus</i> en France en 1995 et 2012 (24).....	14
Tableau 2 : Recommandations du CLSI (2016) pour déterminer les diamètres critiques d'inhibition pour <i>V. parahaemolyticus</i> par la méthode de diffusion en milieu gélosé. R : Résistant ; I : Intermédiaire ; S : Sensible	23
Tableau 3 : Isolement sur milieu gélosé et identification des souches bactériennes par galerie API 20E et/ou par PCR 16S et/ou par PCR R72H ; ND : Non Déterminé ; + : Identification de <i>V. parahaemolyticus</i>	36
Tableau 4 : Critères d'interprétation permettant de déterminer les populations normales et les critères d'interprétation du CLSI (2015) pour les souches de <i>Vibrio</i> ;.....	40
Figure 1 : Coloration des colonies de <i>V. cholerae</i> et de <i>V. parahaemolyticus</i> sur gélose TCBS (https://microbiologyinfo.com)	18
Figure 2 : Coloration de colonies de <i>V. parahaemolyticus</i> (mauve), <i>V. cholerae</i> (bleue), <i>V. vulnificus</i> (bleue) et <i>V. alginolyticus</i> (blanc) sur milieu CHROMagar (www.chromagar.com)	19
Figure 3 : Origine des souches de <i>V. parahaemolyticus</i> étudiées. a) Matrice alimentaire ; b) Origine géographique du produit.	28
Figure 4 : Plan de la boîte d'antibiogramme pour <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	32
Figure 5 : Exemples d'antibiogrammes obtenus sur milieu Mueller-Hinton a) Souche 15-2013 ; b) Souche 16-0006.	37
Figure 6 : Distribution des diamètres d'inhibition (en mm) par antibiotique mesurées pour 248 souches de <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	38
Figure 7 : Souches bactériennes de <i>V. parahaemolyticus</i> classées en fonction du nombre de caractères atypiques.....	41
Figure 8 : Répartition des origines (a.) géographiques et (b.) alimentaires des souches de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ayant un profil atypique.	42
Figure 9 : Poster présenté au congrès ARAE	53

Liste des abréviations

ARBAO: Antibiotic Resistance in Bacteria of Animal Origin

BCC : Bouillon-Coeur-Cervelle

BET : Bromure d'Éthidium

BLSE : Beta-Lactamase à Spectre Étendu

CDC: Center for Disease Control and Prevention

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

DGAL : Direction Générale des Aliments

ECOFF: Epidemiological Cut-off Value

EDTA: Éthylène Diamine Tétra-Acétique

EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

GNS : Gélose Nutritive Salée

LNR : Laboratoire National de Référence

MB: Marine Broth

PCR: Polymerase Chain Reaction

SDS: Sodium Dodecyl Sulfate

TBE: Tris-Borate EDTA

TCBS: Thiosulfate-Citrate-Bile-Saccharose

TDH: Thermostable Direct Haemolysin

TIAC : Toxi-Infection Alimentaire Collective

TRH : TDH-Related Haemolysin

Introduction

Entre 1996 et 2008, en France, les produits de la mer ont été responsables de 1112 foyers déclarés de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC), soit 12,4% du total des TIAC durant cette période (Delmas et al. 2010). L'agent majoritairement incriminé est l'histamine et les autres amines biogènes (67% des TIAC sont dues aux produits de la mer), mais les agents bactériens représentent un risque non-négligeable, compte tenu de leur pathogénie et de leur capacité à évoluer dans l'environnement marin. De plus, un grand nombre d'infections dues aux aliments ne sont pas déclarées et l'agent mis en cause n'est parfois pas identifié voire pas recherché, ce qui amène à penser que le risque bactérien est sous-estimé (1). Les principaux agents responsables de TIAC sont les *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Yersinia enterocolitica*, *Clostridium perfringens* et *Bacillus cereus* ainsi que les entérovirus (www.anses.fr). Les bactéries du genre *Vibrio* sont plus rarement responsables de TIAC. Cependant, *V. parahaemolyticus* est le principal agent responsable de gastro-entérites alimentaires liés aux produits de la mer (2,3). De plus on estime que ces bactéries seraient responsables chaque année aux Etats-Unis de 80 000 infections, conduisant à 500 hospitalisations et 100 décès dont la plupart des hospitalisations et décès sont dus à *Vibrio vulnificus* (4). Le traitement antibiotique est une part importante de la prise en charge thérapeutique d'une infection bactérienne, c'est pourquoi il est important de s'intéresser à la résistance aux antibiotiques chez ces bactéries pathogènes. Le nombre croissant de bactéries pathogènes résistantes aux antibiotiques dirige la médecine moderne vers une ère post-antibiotique dont la réalité se fait de plus en plus ressentir (5). Il est donc important de faire l'état des lieux de l'antibiorésistance, notamment vis-à-vis des antibiotiques critiques en santé humaine, chez les bactéries présentes dans le milieu marin, et plus particulièrement dans les produits de la mer. Le milieu marin est un environnement peu étudié, et potentiellement réservoir des gènes de résistance puisque de nombreuses bactéries s'y développent au contact des antibiotiques résiduels relargués dans l'environnement. Les bactéries du genre *Vibrio* et notamment de l'espèce *Vibrio parahaemolyticus* semblent être de bons modèles à étudier, puisqu'elles sont présentes naturellement dans le milieu marin (6). Elles sont également responsables de TIAC et sont susceptibles d'acquérir et de transmettre des résistances aux antibiotiques grâce à leur capacité à échanger de l'information génétique avec les bactéries

environnantes (7), dont des bactéries potentiellement pathogènes, ce qui représente un risque sanitaire important.

I. *Vibrio spp.*

a. Généralités

La première description d'une bactérie du genre *Vibrio* a été faite en 1854 lorsqu'un médecin italien, Filippo Pacini, observa au microscope des échantillons prélevés dans des tubes digestifs de patients morts de l'épidémie de choléra qui sévissait alors à Florence. Sa conclusion fut que cet organisme était responsable de l'épidémie, mais il se heurte à la théorie des miasmes majoritairement admise à l'époque. Trente ans plus tard, en 1883, Robert Koch et son équipe parviennent à obtenir des cultures pures de *Vibrio cholerae* et associent l'agent observé avec les épidémies de choléra sévissant en Inde et à Alexandrie cette année-là. Ils observent cependant que cette famille de micro-organismes était omniprésente dans les eaux et que bon nombre de ses représentants ne provoquaient pas de maladie (8).

Les *Vibrio* sont des bactéries mobiles à Gram négatif, aéro-anaérobies et capables de respiration, halophiles et généralement oxydase positive (9). Ils sont très largement répandus dans les milieux aquatiques (6). Ils sont en forme de virgules et possèdent un flagelle polaire. Il existe 146 espèces de *Vibrio* (www.ncbi.nlm.nih.gov) dont trois sont les plus souvent retrouvées responsables de toxi-infections alimentaires chez l'Homme : *Vibrio cholerae*, *Vibrio vulnificus* et *Vibrio parahaemolyticus*. Elles seraient responsables chaque année aux Etats-Unis de 80 000 infections, conduisant à 500 hospitalisations et 100 décès dont la plupart des hospitalisations et décès sont dus à *Vibrio vulnificus* (4).

b. Réglementations

Les réglementations européennes n°2073/2005 et 1771/2007 sur les critères microbiologiques ne prévoient pas de méthode de détection des *Vibrio* pathogènes pour l'homme dans les aliments. Il y est cependant noté que des méthodes pour sa détection sont à développer. La Direction Générale des Aliments (DGAL) a donc repris des textes de la réglementation européenne CE relatifs à la sécurité et l'hygiène des denrées alimentaires

d'origine animale et a publié en 2004 puis en 2014 des notes de service contenant des recommandations pour la détection des *Vibrio* dans les matrices alimentaires et la validation des lots (10). La détection de *Vibrio spp.* pathogènes se fait selon la norme **ISO 21872-1 :2017** relative à la recherche de *Vibrio spp.* potentiellement entéropathogènes dans les coquillages et les produits de la pêche.

Les recommandations de la DGAL exigent que, sur cinq échantillons analysés issus d'un même lot d'aliments, aucun ne contienne de *V. parahaemolyticus* producteurs de toxines hémolytiques TDH (Thermostable Direct Hemolysin) et TRH (TDH-Related Hemolysin). Les lots contaminés par une souche possédant au moins une des deux hémolysines sont déclarés non conformes et doivent être retirés du marché et détruits. La présence d'une souche ne possédant pas d'hémolysine n'est pas un critère de non-conformité d'un lot.

II. Prévalence et épidémiologie

a. *Vibrio cholerae*

V. cholerae est une bactérie aquatique autochtone de nombreuses zones à travers le monde. Elle serait originellement endémique de certains pays d'Afrique et d'Asie du Sud (11), mais est maintenant retrouvée dans des estuaires en Australie (12) et à Chesapeake Bay (13). On la retrouve également fréquemment dans les produits de la mer (14), vecteur par lequel elle est responsable d'infections alimentaires.

Vibrio cholerae est l'agent pathogène responsable du choléra, une maladie gastro-intestinale très contagieuse transmise par les aliments ou des eaux contaminés par la bactérie, se présentant sous la forme de diarrhées sévères, principalement répandue dans les pays en voie de développement où sa prévalence est favorisée par les mauvaises conditions sanitaires.

Il est estimé qu'entre 1,3 et 4 millions de cas de choléra apparaissent chaque année, responsables d'environ 95 000 décès par an (15).

b. *Vibrio parahaemolyticus*

V. parahaemolyticus est naturellement présent dans le milieu marin et dans un grand nombre de produits de la mer. Cette bactérie a notamment été isolée dans des échantillons

alimentaires prélevés sur des marchés dans le Sud-Est Asiatique (16,17). Elle a également été isolée dans des crevettes en Thaïlande, qui est un pays producteur et exportateur majeur de crevettes (18). Cette étude a rapporté la présence de *V. parahaemolyticus* dans 6 échantillons sur 16 analysés, à des niveaux de contamination allant jusqu'à $6,3 \cdot 10^6$ micro-organismes/g. Leur présence a aussi été rapportée dans des échantillons d'eau de mer, de crevettes et de coques (144 échantillons positifs sur 400) prélevées en Malaisie (19), ainsi que dans des huîtres et des palourdes prélevées à Taïwan (20) avec environ 70% d'échantillons positifs sur 120 prélèvements. Une étude menée sur des cultures d'huîtres en Alaska a noté la présence de *V. parahaemolyticus* dans 31 échantillons sur 96 (21). *V. parahaemolyticus* est également retrouvé dans les eaux et produits marins en Europe, avec notamment des souches isolées dans tous les échantillons prélevés au cours d'une étude menée sur des crabes dans la Tamise (22) ainsi que dans 35,3% des échantillons prélevés au cours d'une étude portant sur les eaux des côtes galiciennes (117/331) (23).

V. parahaemolyticus est le principal agent responsable de gastro-entérites alimentaires liés aux produits de la mer (2,3). La contamination se fait par consommation de poissons et fruits de mer crus, insuffisamment cuits ou re-contaminés après cuisson (24). Son pouvoir pathogène est dépendant des deux hémolysines entérotoxiques TDH et TRH (25). Au Japon, on estime que *V. parahaemolyticus* serait responsable de 20 à 30% des infections alimentaires (26). En Europe, les « *Vibrioses* » non cholériques ne sont pas à déclaration obligatoire, leur incidence est donc probablement sous-estimée, d'autant plus que cet agent pathogène est très rarement recherché dans le cas de gastro-entérites. On rapporte cependant plusieurs toxi-infections alimentaires collectives à *V. parahaemolyticus* en Europe entre 1995 et 2012 (Tableau 1). Une infection notable en France en 1997 impliquait 44 patients ayant consommé des crevettes importées d'Asie (27).

Tableau 1 : Epidémies dues à *Vibrio parahaemolyticus* en France en 1995 et 2012 (24)

Espèce	Nombre de souches reçues au CNR	Formes cliniques (nombre de cas)	Nombre de décès	Contexte de contamination
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	25	Gastro-entérite (20)	-	consommation de produits de la mer (13), ND (6), NE (1)
		Septicémie (2)	1	ND (2)
		Suppurations diverses (2)	-	consommation de produits de la mer (1), contact avec l'eau de mer (1)
		Plaie + septicémie (1)	1	contact avec l'eau de mer (1)

c. *Vibrio vulnificus*

Comme les autres espèces du genre *Vibrio*, *V. vulnificus* fait partie de la flore communément retrouvée dans les eaux d'estuaires (28) et dans les produits de la mer (29,30). Sa concentration dans l'eau est relativement faible (< 10 UFC/ml) (31). Dans les produits de la mer, et notamment les coquillages et mollusques, elle peut s'élever à 10³ UFC/g de tissus (32) à cause de la capacité de ceux-ci à filtrer l'eau. Cependant cette concentration varie en fonction de la salinité de l'eau.

Cette espèce bactérienne a été trouvée dans 13,6% des huîtres de l'espèce *Cassostrea gigas* échantillonnées en Nouvelle-Zélande (33). Il a également été observé qu'entre 37% et 69% des poissons prélevés dans le Golfe du Mexique étaient positifs pour *V. vulnificus* (34). Dans cette étude il a été noté que la prévalence de *V. vulnificus* sur les poissons augmentait en fonction de la température de l'eau et diminuait en fonction de sa salinité.

Vibrio vulnificus est responsable de 95% des décès dus à des infections alimentaires liées aux produits de la mer au Etats-Unis, et est responsable d'un taux de létalité pouvant aller jusqu'à 50%. Les affections chroniques ou immunitaires sous-jacentes sont un probable facteur de risque (35). C'est le pathogène lié aux produits de la mer engendrant la plus grande dépense de santé aux Etats-Unis, avec un coût annuel de 233 millions de dollars (36). La plupart des patients atteints sont des hommes âgés de 40 ans ou plus. Cette disparité du sex-ratio pourrait être due à un effet protecteur de l'œstrogène contre l'endotoxine bactérienne mais actuellement aucune donnée ne permet d'expliquer le lien entre l'âge et la prévalence (37).

III. Virulence et pathologie

a. *Vibrio cholerae*

Les sérotypes de *V. cholerae* épidémiques pour l'homme sont les sérotypes O1 et O139, retrouvés majoritairement dans les eaux stagnantes dans les pays en voie de développement. Les autres sérotypes, appelés sérotypes non-O1, non-O139, sont ubiquitaires mais ne présentent pas de risque épidémique, provoquant simplement des diarrhées simples et souvent non

diagnostiquées. Les principaux vecteurs de contamination humaine sont l'eau et certains organismes tels que les zooplanctons, certains insectes et les cyanobactéries.

Après ingestion, les germes prolifèrent pour tapisser la muqueuse intestinale et adhèrent à la bordure en brosse par leur pilis grâce à une protéine codée par le gène *tcpA* (38). La pathologie due à *Vibrio cholerae* est provoquée principalement par une toxine cholérique CT codée par les gènes *ctxA* et *ctxB* (39). Cette toxine se fixe à un récepteur lipidique situé à la membrane des entérocyte et active l'adénylate cyclase, ce qui augmente la production d'AMPc intracellulaire et l'excrétion d'ions sodium, ce qui provoque une fuite d'eau et d'électrolytes dans la lumière de l'intestin grêle.

b. *Vibrio parahaemolyticus*

Le pouvoir pathogène de *V. parahaemolyticus* est dépendant de deux hémolysines entérotoxiques TDH (Thermostable Direct Hemolysin) et TRH (TDH-Related Hemolysin) (25) qui sont responsables d'une β -hémolyse sur gélose au sang appelée Phénomène de Kanagawa (KP). Ce phénomène est spécifique des souches pathogènes, puisque seules 0,2 à 2% des souches environnementales possèdent les gènes codant pour ces toxines (40,41).

La toxine TDH se polymérise pour former des pores (42) dans la membrane des érythrocytes, ce qui provoque une fuite d'eau et d'ions et la lyse des érythrocytes (43). De plus, TDH et TRH semblent jouer un rôle dans l'induction de la diarrhée aqueuse provoquée par *V. parahaemolyticus*. En effet, TDH et TRH se fixent à la membrane apicale des entérocytes et induisent l'ouverture des canaux Cl^- calcium-dépendant ce qui perturbe le flux d'ions et provoque une libération d'eau et d'électrolytes dans la lumière du tube digestif (44).

De plus, on sait qu'il existe deux systèmes de sécrétion de type III (T3SS) récurrents chez cette espèce (45), et il a été démontré qu'ils jouaient un rôle dans la pathogénie (46). T3SS1 est apparenté au système de sécrétion Ysc de *Yersinia* et induit une cytolysse des cellules cibles sous l'influence d'une élévation de la température et d'une diminution du taux de calcium (47). T3SS2 est quant à lui similaire au système Hrp1 de *Pseudomonas syringae* (45) et joue un rôle dans l'inflammation et la perturbation du cytosquelette et des voies de signalisation de la cellule cible (21).

Le sérotypage de *V. parahaemolyticus* se fait grâce aux antigènes somatique O et de capsule K. Actuellement, le principal clone pandémique est le clone O3:K6 (48). En Europe,

les *Vibrioses* non cholériques ne sont pas à déclaration obligatoire, leur incidence est donc probablement sous-estimée. On rapporte cependant plusieurs toxi-infections alimentaires collectives à *V. parahaemolyticus* en Europe entre 1995 et 2012 (24).

c. *Vibrio vulnificus*

Le principal mode de contamination est la consommation d'huîtres crues ou mal cuites qui concentrent les bactéries lorsqu'elles filtrent l'eau. Après une période d'incubation de 26h environ, le patient développe une septicémie accompagnée de symptômes tels que des nausées, fièvre, hypotension, frissons et douleurs abdominales, puis des lésions secondaires telles que des nécroses cutanées et des lésions bulleuses, principalement aux extrémités (35). Une des raisons serait que la température du corps y est plus proche de la température optimale de croissance de ces bactéries (30°C). De plus, il a été rapporté que *V. vulnificus* était capable d'engendrer des infections - et des décès - suite à des contacts entre des blessures ouvertes et des eaux contaminées, ou du matériel souillé par de l'eau contaminée (49). On dénombre trois biotypes de *V. vulnificus*, dont le biotype 1, principal pathogène pour l'Homme et impliqué dans pratiquement toutes les infections dues à cette bactérie (31), et le biotype 3, responsable plus rarement d'infections de blessures (50). Le biotype 1 est réparti en deux génotypes identifiables par PCR, le génotype C et le génotype E (49). Le génotype E regroupe environ 85% des souches retrouvées dans l'environnement, alors que les souches retrouvées dans des isolats cliniques appartiennent presque exclusivement au génotype C (51). Cela pourrait expliquer le relativement faible nombre d'infections dues à cette bactérie, en comparaison à sa présence dans l'environnement. Une autre explication serait que *V. vulnificus* est un pathogène opportuniste et qu'il nécessiterait une pathologie chronique pré-existante pour pouvoir exprimer sa pathogénicité, comme démontré par Bross *et al.* en 2007 (52), notamment des affections entraînant une augmentation du taux de fer sérique. En effet, le fer serait un élément essentiel à la survie et la prolifération de *V. vulnificus* dans l'organisme (53). De ce fait, les infections dues à *V. vulnificus* sont plus fréquents chez les patients atteints d'hémochromatose (54).

La virulence de *V. vulnificus* repose sur trois éléments essentiels : la capsule polysaccharidique permettant d'éviter la phagocytose (55), l'endotoxine lipopolysaccharide de

surface (56) ainsi que la toxine RtxA (57). Cette toxine induirait une apoptose des cellules épithéliales de l'intestin (58).

IV. Méthodes d'identification

Les bactéries du genre *Vibrio* peuvent être cultivées sur un milieu gélosé nutritif à 37°C. On utilise généralement des milieux sélectifs pour les isoler. Par exemple le milieu Thiosulfate-Citrate-Bile-Saccharose (TCBS) sur lequel les colonies sont colorées en fonction de leur capacité à fermenter le saccharose. Sur ce milieu, *V. parahaemolyticus* donne des colonies vertes (pas de fermentation du saccharose) et *V. cholerae* ainsi que *V. vulnificus* donnent des colonies jaunes (fermentation du saccharose) (Figure 1). Des bactéries non-*Vibrio* peuvent également pousser sur ce milieu, telles que *Aeromonas hydrophila* ou *Pseudomonas spp* (colonies vert-bleues).

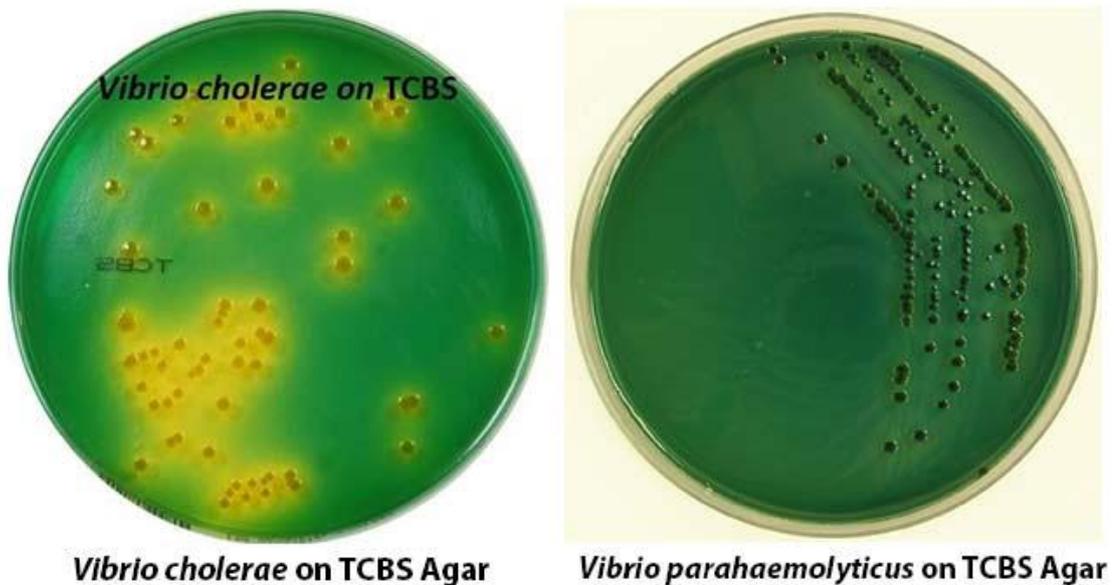


Figure 1 : Coloration des colonies de *V. cholerae* et de *V. parahaemolyticus* sur gélose TCBS (<https://microbiologyinfo.com>)

On peut également utiliser le milieu chromogène CHROMagar *Vibrio* sur lequel *V. parahaemolyticus* donne des colonies mauves et *V. cholerae* ainsi que *V. vulnificus* donnent des colonies bleues (Figure 2).



Figure 2 : Coloration de colonies de *V. parahaemolyticus* (mauve), *V. cholerae* (bleue), *V. vulnificus* (bleue) et *V. alginolyticus* (blanc) sur milieu CHROMagar (www.chromagar.com)

La norme ISO/TS 21872 concerne la détection de *Vibrio spp.*, potentiellement entéropathogènes, dans les produits de la mer. Elle contient une procédure de détection et d'identification de *Vibrio*. Les échantillons à analyser doivent être homogénéisés dans de l'eau peptonée tamponnée (EPT) de façon à être dilués au 1/10, puis incubés à 41,5°C pendant 6h. La suspension obtenue doit à son tour être diluée au 1/10 dans de l'EPT et incubée à 41,5°C pendant 18h. Des géloses TCBS et CHROMagar doivent ensuite être ensemencées à l'aide de cette suspension et mises à incuber à 37°C pendant 24h pour être lues afin de rechercher des colonies caractéristiques. Les colonies caractéristiques doivent ensuite passer une série de tests biochimiques (oxydase, galerie API20^E), puis les facteurs de virulence peuvent être recherchés par des méthodes de biologies moléculaires (PCR *tdh*, *trh* etc...). La réglementation interdit la présence de *Vibrio spp.* pathogènes dans les produits de la pêche mais ne concerne pas les souches ne possédant pas de facteurs de virulence, qui sont donc tolérées.

La norme n'exige pas la mise en place de tests de biologie moléculaire pour l'identification des *Vibrio*.

L'identification de bactéries du genre *Vibrio* peut néanmoins se faire grâce à l'amplification de gènes tel que le gène *toxR* (59). Ce gène code pour l'activateur transcriptionnel ToxR. Il est présent chez différentes espèces de *Vibrio* mais avec une faible homologie entre les espèces (52% d'homologie entre le gène codé chez *V. parahaemolyticus* et

chez *V. cholerae*) (60). Il permet de discriminer avec une grande sensibilité les espèces du genre *Vibrio* (61).

La Polymerase Chain Reaction (PCR) en temps réel de la séquence R72H du génome de *V. parahaemolyticus* permet d'identifier comme étant, ou non, *V. parahaemolyticus* puisque cette séquence est spécifique de cette espèce (62,63). Cette séquence est composée d'un fragment non-codant et d'un gène codant pour une phosphatidylsérine synthétase (64).

De même la PCR du gène 16S codant pour l'ARN ribosomique 16S de la petite sous-unité du ribosome des procaryotes permet d'identifier des espèces bactériennes des espèces du genre *Vibrio*, et notamment *V. parahaemolyticus*, de par sa structure. Il est composé de fragments hyper-variables permettant la discrimination entre les souches et de fragments très conservés permettant d'utiliser des amorces universelles pour être théoriquement amplifié chez toutes les espèces bactériennes le possédant (65).

V. Résistance aux antibiotiques

a. Mécanismes de résistance

Chez les bactéries, la résistance aux antibiotiques est conférée par plusieurs mécanismes : la production d'une enzyme de dégradation de l'antibiotique via un gène de résistance, la modification de la cible de l'antibiotique, la production de pompes à efflux permettant une évacuation de l'antibiotique du cytoplasme et la modification de la perméabilité membranaire empêchant l'antibiotique de rentrer dans la cellule.

Chez *V. parahaemolyticus*, tout comme chez *V. vulnificus*, la résistance à l'ampicilline est conférée par la production d'une pénicillinase codée par le gène *bla_{TEM}* (66). D'autres gènes de résistance ont également été trouvés chez *V. parahaemolyticus*, tels que *sul2* (résistance aux sulfamides), *strA* et *strB* (résistance à la streptomycine), *tetG*, *tetB* et *tetH* (résistance à la tétracycline) (66). Il a également été observé chez *V. parahaemolyticus* la présence de céphalosporinases de type *bla_{PER-1}* et *bla_{CMY-2}* (67).

Chez *V. cholerae*, une souche issue d'un prélèvement fécal réalisé chez un patient atteint de choléra en Inde était résistante aux céphalosporines de troisième génération et possédait une bêta-lactamase de type *bla_{DHA}* et une carbapénémase *bla_{NDM-1}* (68,69). Il a également été observé la présence de gènes codant pour des carbapénémases chez *V. cholerae*, tel que le gène

VCC-1 (70). Dans une étude réalisée sur des *V. cholerae* issus de prélèvements d'eaux et de produits de la mer, il a été observé une occurrence élevée de gènes de résistances tels que *ermA* (97/99), *sul1* (86/99) et *sul2* (49/99) (71).

La plupart des acquisitions de résistance se fait grâce au transfert horizontal de plasmides ou de transposons portant des gènes de résistance, au sein d'une même espèce ou d'une espèce à l'autre (7).

b. Techniques d'antibiogramme

L'augmentation du nombre de bactéries pathogènes résistantes aux antibiotiques a conduit à une volonté de regrouper les différents plans de surveillance. Dans ce but, une action européenne, l'« Antibiotic Resistance in Bacteria of Animal Origin » (ARBAO) a été mise en place en 2000. De cette action sont issues des recommandations ayant permis à plusieurs pays européens de mettre en place des plans nationaux de surveillance de l'antibiorésistance chez les bactéries d'origine animale (72). Ces plans de surveillance concernent des bactéries issues du milieu terrestre, soit des bactéries zoonotiques pathogènes pour l'homme (*Salmonella* et *Campylobacter*), soit des bactéries indicatrices, témoins de l'état d'antibiorésistance d'un environnement, telles que *Escherichia coli* et *Enterococcus faecium* et *faecalis*. Il n'existe, en revanche, aucun plan de surveillance et très peu de données portant sur l'antibiorésistance des bactéries dans les produits issus de la mer.

La mesure de la résistance aux antibiotiques chez les bactéries peut se faire par des méthodes de dilution des antibiotiques en milieu liquide ou solide, ou par diffusion des antibiotiques en milieu solide (73,74).

La diffusion par disque consiste à faire se développer un tapis bactérien en présence d'un disque imprégné d'antibiotique à une concentration définie qui va diffuser dans la gélose et inhiber la croissance des colonies à un diamètre plus ou moins grand autour du disque (75). Ce diamètre correspond au diamètre d'inhibition permettant de déterminer la sensibilité ou la résistance d'une bactérie à un antibiotique. Cette technique est utilisée en routine au laboratoire et permet d'étudier sur un seul inoculum un grand nombre d'antibiotiques différents et de déceler d'éventuelles synergies. Elle est en revanche limitée par les conditions de culture spécifiques de certaines bactéries (bactéries intra-cellulaires, bactéries anaérobies) et par le fait

que certains antibiotiques diffusent mal dans les milieux gélosés. De plus des variations des conditions utilisées (densité de l'inoculum initial, pH, salinité...) peuvent conduire à interpréter des sensibilités ou des résistances erronées. Les diamètres d'inhibition peuvent être sources de biais puisqu'ils sont déterminés ou ajustés le plus souvent visuellement et qu'ils ne peuvent pas être inférieurs à 6 mm (diamètre du disque) ce qui occulte certaines variations de résistance.

Il existe une méthode dérivée, appelée E-test, qui consiste à utiliser une bande de papier imprégnée d'un gradient de concentration d'un antibiotique qui sera déposée sur un milieu gélosé ensemencé avec la bactérie d'intérêt. Elle permet de déterminer plus précisément la concentration minimale inhibant la croissance de la bactérie (CMI).

La méthode de dilution en milieu liquide reste une méthode de référence et consiste à ensemencer une gamme de dilution de demi en demi d'un antibiotique avec un inoculum standardisé. Il permet de déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) qui est la concentration inhibant complètement la croissance bactérienne. Cette méthode permet de tester un plus grand nombre de bactéries et d'antibiotiques différents mais l'écart parfois important entre les dilutions successives la rend peu précise. De plus elle ne permet pas de déceler d'interactions entre les antibiotiques et nécessite un essai par antibiotique à tester.

c. Etude de l'antibiorésistance

Pour réaliser et interpréter les antibiogrammes, il existe différents référentiels standardisés. Par exemple le référentiel du CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) aux Etats-Unis et le référentiel de l'EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) en Europe. Ces deux référentiels retiennent des critères d'interprétation différents pour déterminer la résistance ou la sensibilité d'une souche bactérienne à un antibiotique donné. De plus, les notions utilisées dans chacun des deux référentiels (« breakpoint » et « cut-off » ou ECOFF pour « Epidemiological Cut-off Value ») sont à prendre en compte. En effet, ces deux notions ne sont pas à utiliser dans le même contexte et tendent à exacerber les différences d'interprétation.

Dans le milieu médical, on parle de « breakpoint » pour déterminer la résistance antimicrobienne d'une souche clinique, en définissant des valeurs servant à classer les souches comme Sensibles (S), Intermédiaires (I) ou Résistantes (R) afin de justifier la mise en place d'un protocole thérapeutique. En épidémiologie, le terme « ECOFF » définit une valeur seuil

servant à séparer une population microbienne en deux sous-populations : sauvage ou non-sauvage en fonction du diamètre d'inhibition d'un antibiotique ou bien de sa concentration minimale inhibitrice (CMI). Pour un antibiotique donné, les bactéries sauvages sont les souches dont la sensibilité est égale ou supérieure à la valeur seuil et les bactéries non-sauvages sont les souches plus résistantes à cet antibiotique. Ce référentiel permet d'observer une diminution de la sensibilité d'une souche bactérienne à un antibiotique, ce qui ne signifie pas forcément l'acquisition d'une résistance clinique.

Dans le cas de *V. parahaemolyticus*, l'EUCAST ne donne en 2018 pas de recommandations pour la réalisation d'antibiogrammes (73). Les seules recommandations existantes concernent la réalisation d'un antibiogramme par diffusion des antibiotiques et sont données dans le référentiel du CLSI (Tableau 2) (76). Ces recommandations sont adaptées des critères interprétatifs pour les *Enterobacteriaceae* et les *Staphylococcus spp.*

Tableau 2 : Recommandations du CLSI (2016) pour déterminer les diamètres critiques d'inhibition pour *V. parahaemolyticus* par la méthode de diffusion en milieu gélosé.

R : Résistant ; I : Intermédiaire ; S : Sensible

Antibiotique	Charge du disque (µg)	Diamètres critiques d'inhibition (mm)		
		R	I	S
Ampicilline	10	≤13	14-16	≥17
Amoxicilline-acide clavulanique	20/10	≤13	14-17	≥18
Cefotaxime	30	≤22	23-25	≥26
Cefoxitine	30	≤14	15-17	≥18
Ceftazidime	30	≤17	18-20	≥21
Gentamicine	10	≤12	13-14	≥15
Tetracycline	30	≤11	12-14	≥15
Ciprofloxacine	5	≤12	13-15	≥16
Cotrimoxazole	1,25/3,75	≤10	11-15	≥16
Chloramphénicol	30	≤12	13-17	≥18

d. Epidémiologie de la résistance aux antibiotiques chez *Vibrio*

V. parahaemolyticus présente fréquemment des résistances à l'ampicilline. On observe également de fréquentes résistances à la colistine chez tous les *Vibrio* (77). Les *Vibrio*

halophiles (*V. parahaemolyticus* et *V. vulnificus*) sont généralement résistants aux sulfamides et aux céphalosporines de première et deuxième génération (76). Il n'existe pas de publication ni de recommandations indiquant les résistances intrinsèques de *V. parahaemolyticus* qui demeurent très peu décrites dans la littérature.

Une étude menée par Sahilah *et al.* (78) portant sur trente-sept isolats issus de coques en Malaisie a démontré une émergence de résistance à la bacitracine (92%), à la pénicilline (89%), à l'ampicilline (68%), au céfuroxime (38%), au ceftazidime (14%) et à l'amikacine (6%). Il a également été rapporté des résistances multiples pour certains antibiotiques utilisés en clinique (gentamicine, tétracycline), a fortiori lorsque les bactéries étaient issues d'un biofilm (79). Tout comme les résistances intrinsèques, les résistances acquises par *V. parahaemolyticus* sont très peu décrites et restent à déterminer.

De forts taux de résistance aux antibiotiques ont été décrits chez des *Vibrio spp.* (80), notamment à l'ampicilline, à l'association ampicilline-sulbactame et à la tétracycline (100% de résistances pour chaque antibiotique), à la ceftazidime (97,2%), au céfotaxime et à la ciprofloxacine (91,7%), au cotrimoxazole (75%), à l'acide nalidixique (69,4%) et au chloramphénicol (61,1%). Cette étude a été réalisée sur des *V. cholerae* et des *V. parahaemolyticus* mais ne précise pas la répartition des résistances en fonction des espèces.

S'il y a peu de données portant sur la résistance aux antibiotiques chez *V. parahaemolyticus*, un plus grand nombre d'études portent sur *V. cholerae*. *V. cholerae* est généralement sensible aux pénicillines, on observe également de fréquentes résistances à la colistine, comme chez tous les *Vibrio* (77).

Une étude a été réalisée sur des isolats de *V. cholerae* au cours d'une épidémie de choléra au Ghana en 2014. Les *V. cholerae* isolées étaient de type O1 et présentaient de fréquentes résistances au cotrimoxazole (95%), à l'ampicilline (90%) et à la ceftriaxone (75%), avec un portage à 95% d'un élément mobile SXT porteur d'un grand nombre de gènes de résistances (81). Une étude similaire portant sur des *V. cholerae* issus de selles de patients atteints de gastro-entérites au Népal a permis d'observer des résistances au cotrimoxazole (100% de résistances), à l'acide nalidixique (90%) et à l'ampicilline (67%) (82).

Les souches non-O1/O-139 ne sont pas responsables d'épidémies, néanmoins leur omniprésence rend leur étude intéressante pour évaluer l'évolution des profils

d'antibiorésistance des bactéries d'un environnement. Il a été rapporté plusieurs cas d'infections par des bactéries non-O1/non-O139 multirésistantes. Entre 1995 et 2001, Tjaniadi *et al.* (2003) (83) ont collecté en Indonésie des souches non-O1 pathogènes, résistantes à l'ampicilline, au chloramphénicol, à la tétracycline et au cotrimoxazole. Entre 2000 et 2004, en Inde, des souches pathogènes non-O1/non O-139 résistantes aux fluoroquinolones ont été rapportées (84) et en 2002 en Inde également, des souches non-O1/non-O139 résistantes à l'ampicilline, à l'acide nalidixique et au cotrimoxazole ont été identifiées (85). Une étude réalisée sur des *V. cholerae* non-O1/non-O139 issus de l'environnement et de prélèvements cliniques a permis d'observer 96% de résistances à la colistine et 22% de résistances à l'ampicilline (86).

Bien que ne présentant pas nécessairement d'enjeu thérapeutique direct, ces acquisitions de résistance peuvent poser problème étant donné la capacité des *Vibrio* à partager leurs informations génétiques (87,88). Dans l'environnement ou dans le tractus digestif, ces résistances peuvent être transmises à des bactéries avec lesquelles elles sont en contact et rendre le traitement d'infections par d'autres germes plus difficile.

V. vulnificus présente fréquemment des résistances à l'ampicilline. Des résistances aux sulfamides ont également été observées. Une étude portant sur 33 souches, isolées en Chine à partir de crevettes destinées à la consommation, a mis en évidence des résistances au céfépime (3,03%), à la tétracycline (6,06%), à l'aztréonam (24,24%), à la streptomycine (45,45%), à la gentamicine (93,94%), à la tobramycine (100%) et à la céfazoline (100%) (89). Une autre étude portant sur des souches de provenance similaire a mis en évidence des résistances acquises à l'amikacine, à l'ampicilline, à la tétracycline et à la gentamicine (90). Baker-Austin *et al.* (91) ont testé 350 isolats issus d'eaux et de sédiments de la côte sud-est des Etats-Unis, ainsi que dix isolats cliniques, et ont mis en évidence des résistances multiples dans 17,3% des isolats dont certaines concernant des antibiotiques utilisés pour le traitement des septicémies à *V. vulnificus*.

Ces études associées suggèrent que l'environnement constitue un important réservoir de bactéries résistantes qui pourraient à l'avenir être retrouvées en clinique humaine ou vétérinaire.

VI. Traitements

a. *Vibrio cholerae*

Le traitement de la diarrhée cholérique implique une réhydratation d'urgence par voie intraveineuse avec l'administration massive d'eau et d'électrolytes, ce qui permet au système immunitaire de prendre en charge les *Vibrio*. Cependant, ce traitement prophylactique peut être accompagné d'un traitement antibiotique composé d'une tétracycline ou de cotrimoxazole par voie orale. Ce traitement réduit la durée des symptômes et la quantité ainsi que la durée d'excrétion fécale de *V. cholerae* (<http://www.who.int>).

b. *Vibrio parahaemolyticus*

De même que pour les infections à *V. cholerae*, il n'est pas obligatoire de mettre en place un traitement antibiotique pour soigner une infection à *V. parahaemolyticus* puisqu'une réhydratation suffit jusqu'à la guérison spontanée de l'infection. Dans les cas les plus sévères ou en cas de septicémie, il est en revanche possible d'administrer des antibiotiques tels que de la tétracycline ou de la ciprofloxacine. Dans le cas de la diarrhée du voyageur, de nouvelles recommandations préconisent un traitement à base d'azithromycine et de ciprofloxacine (92).

c. *Vibrio vulnificus*

Lorsqu'une infection par *V. vulnificus* est suspectée, le traitement doit être mis en place durant les 72h suivant l'exposition, sous peine de voir le taux de létalité de la septicémie atteindre 100% (93). Il comporte une antibiothérapie par doxycycline et une céphalosporine de troisième génération ou par une association de cotrimoxazole associé à un aminoside en cas de contre-indication (chez les enfants notamment) (94). Le cas échéant, le traitement peut également comprendre un débridage de la zone nécrosée voire une amputation du membre atteint pour les formes les plus sévères.

VII. Présentation du sujet

V. parahaemolyticus est naturellement présente dans l'eau et les produits marins. Il existe un potentiel risque d'augmentation de sa prévalence en raison du réchauffement climatique qui élève la température des eaux et les rend plus propices au développement de cette espèce (95). Actuellement, il existe peu d'études portant sur l'antibiorésistance des bactéries isolées des produits de la mer, et notamment de *V. parahaemolyticus*. Sa pathogénicité est souvent sous-évaluée et elle est capable d'échanger un grand nombre d'informations génétiques avec les bactéries environnantes, conférant à cette bactérie un potentiel intermédiaire permettant à des bactéries plus pathogènes d'acquérir des gènes de résistance (7). Cela peut poser problème si les résistances acquises concernent des antibiotiques critiques en santé humaine. Il semble donc intéressant de dresser un état des lieux permettant de mieux évaluer les risques potentiels liés à cette espèce.

Le travail réalisé au cours de cette étude a consisté à réaliser l'identification bactérienne de souches de *Vibrio*, isolées de produits de la pêche, par des tests biochimiques et par biologie moléculaire, puis de réaliser des antibiogrammes pour déterminer la sensibilité de ces souches à un panel d'antibiotiques. Il n'existe pas de recommandations officielles pour interpréter les valeurs des diamètres d'inhibition obtenues par la méthode de l'antibiogramme par diffusion en disques, et ce travail avait pour objectif de tenter de déterminer des critères d'interprétation en testant de nombreuses souches. Afin de réaliser des antibiogrammes sur un nombre plus important de souches et faciliter l'exploitation statistique des résultats, d'autres souches ont également été analysées (isolées de produits de la pêche au laboratoire, au cours de précédents travaux).

Matériel et méthodes

I. Origine des souches

Deux-cent quarante-huit souches de *Vibrio parahaemolyticus* ont été étudiées. Les souches ont été collectées au Laboratoire de Sécurité des Aliments de l'Anses, département des Produits de la Pêche et de l'Aquaculture, situé à Boulogne-sur-Mer. Cette collecte a eu lieu entre 2012 et 2016 dans le cadre de l'activité de prestations analytiques des produits de la pêche du laboratoire, ainsi que dans sa fonction de Laboratoire National de Référence (LNR) de *Vibrio sp.* dans les produits de la pêche. Ces souches ont été isolées à partir de différentes matrices alimentaires provenant de diverses origines géographiques. Sur les 248 souches analysées, 180 ont été isolées de crevettes, 17 de gambas, 7 de poissons, une de calamar et 43 de matrices

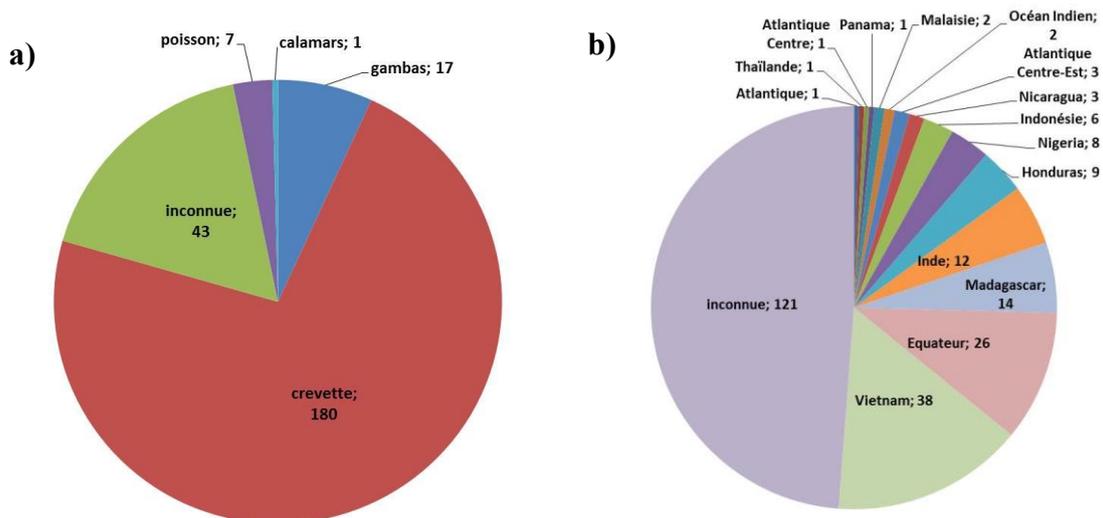


Figure 3 : Origine des souches de *V. parahaemolyticus* étudiées. a) Matrice alimentaire ; b) Origine géographique du produit. alimentaires non définies (Figure 3). Les origines des produits de la pêche étaient pour 38 du Vietnam, 26 d'Equateur, 14 de Madagascar, 12 d'Inde, 37 d'autres origines et 121 d'origine géographique inconnue.

Les souches ont été isolées et identifiées selon la norme ISO/TS 21872 relative à la recherche de *Vibrio spp.* potentiellement entéropathogènes dans les coquillages et produits de la pêche. Elles ont ensuite été stockées à -80°C dans un milieu Bouillon Cœur-Cerveille (BCC) ou Marine Broth (MB, Difco) supplémenté de 20% de glycérol (VWR, Radnor, USA).

II. Identification biochimique (Galerie API 20^E)

Des tests biochimiques ont été réalisés sur des souches à identifier. Des galeries API 20E (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France) ont été ensemencées avec les souches d'intérêt en suspension dans de l'eau physiologique contenant 0,85% de NaCl puis incubées à 37°C pendant 18 à 24h. La lecture a ensuite été faite à l'aide d'un lecteur Biomic (Giles Scientific, Santa Barbara, USA). Le code d'identification a été confronté à la banque de données interne de l'appareil.

III. Identification moléculaire

a. Extraction d'ADN

Les ADN des souches d'intérêt ont été extraits grâce à un kit d'extraction DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Les Ulis, France). Les souches à analyser ont été repiquées sur des géloses nutritives salées (GNS, Oxoid) contenant 2% de NaCl puis incubées à 37°C pendant 24h. Quelques colonies ont ensuite été prélevées et suspendues dans 180 µL de tampon de lyse ATL (Animal Tissue Lysis) contenant du dodécylsulfate de sodium (SDS), dont le rôle est d'éliminer les nucléases susceptibles de dégrader l'ADN. A cette suspension sont ajoutés 20 µL de protéinase K permettant de lyser les protéines présentes dans la suspension. La lyse des cellules se fait ensuite en portant le mélange à 56°C pendant 3h. Après la lyse, 4 µL de RNase sont ajoutés au mélange pour éliminer l'ARN bactérien. Puis 200 µL de tampon AL qui contient des sels de guanidine pour faciliter la liaison de l'ADN à la colonne sont ajoutés à la suspension. Le tampon AL ayant tendance à précipiter avec le SDS, 200 µL d'éthanol sont ajoutés au mélange pour remettre le précipité en solution. Le tout est ensuite déposé sur une colonne de silice puis centrifugé pendant une minute à 8000 rotation par minutes. Les débris cellulaires sont élués et le pH acide des tampons permet à l'ADN de rester fixé sur la colonne. On opère ensuite à deux lavages à l'aide de tampons AW1 et AW2 servant à éluer de la colonne les sels et les protéines dénaturées. Le tampon AW1 contient de l'hydrochloride de guanidine, servant à dénaturer les protéines. Le tampon AW2 contient 70% d'éthanol et sert à éluer les sels pour purifier l'ADN fixé sur la colonne. Un dernier tampon AE est passé sur la colonne. Il contient

de l'acide chlorhydrique et de l'EDTA (acide Éthylène Diamine Tétra-Acétique) à pH 9 qui permet de détacher l'ADN de la silice.

b. PCR de du gène 16S rRNA

Les amorces utilisées sont les amorces ENV1 (Forward, 5'- AGA GTT TGA TII TGG CTC AG -3') et ENV2 (Reverse, 5'- CGG ITA CCT TGT TAC GAC TT -3') (Olofsson, Ahrné, and Molin 2007). Les extraits d'ADN des souches à identifier ont été déposés dans une plaque 96 puits avec le mélange réactionnel. Le volume final était de 50 μ L par puits, soit 0,25 μ L de chaque amorce à 50 μ M (Eurobio, Les Ulis, France), 0,25 μ L de Taq polymérase (Hot Start Taq DNA Polymerase, Qiagen) à 5 U/ μ L, 1 μ L de désoxyribonucléotide-triphosphates (dNTP) à 10mM (Eurobio), 5 μ L de tampon de PCR 10X (Qiagen), 2,5 μ L d'extraits d'ADN et 43,25 μ L d'eau purifiée sans nucléase. Deux puits avec des témoins négatifs (mélange réactionnel et eau, sans ADN) sont également préparés. L'amplification de l'ADN a été réalisée grâce à un thermocycleur iCycler (Biorad, France). La réaction de PCR commence par une première phase de 15 minutes à 95°C correspondant à une pré-dénaturation suivi d'une étape de dénaturation de l'ADN double-brin (94°C, 45 secondes), d'hybridation des amorces (48°C, 45 secondes) puis d'élongation des amplicons (72°C, 1 minute). Le cycle est répété 35 fois et se termine par une dernière élongation à 72°C pendant 10 minutes. Les amplicons ont ensuite été stockés à 4°C pendant un temps maximum de 48h.

Avant le séquençage, ils sont déposés sur un gel d'agarose à 0,8% (m/v) avec du tampon Tris-Borate EDTA (TBE, KD Medical) 1 X en présence de bromure d'éthidium (BET, Invitrogen) à 1% (v/v). Le dépôt se fait avec 10 μ L d'amplicons mélangés à 2 μ L tampon de charge 6 X (Eurobio). Le tampon de charge sert à augmenter la densité de la suspension contenant l'amplicon pour l'aider à descendre dans le puit et à la colorer pour confirmer visuellement la migration. La migration se fait à 125 V pendant 1h20. La distance de migration est évaluée à l'aide d'un marqueur de taille DNA Ladder (BioLabs) échelonné tous les 100 paires de bases (bp).

Après migration, le gel a été observé et photographié sous UV avec un lecteur de gel Quantum ST4 1100. La lumière UV permet de détecter le BET qui s'intercale entre les bases de l'amplicon. Les amplicons attendus mesurent 1505 bp.

L'amplicon était ensuite envoyé pour séquençage à la société privée Genoscreen (Lille,

France). La séquence du gène obtenue a été confrontée à la banque de données du site BLAST (www.blast.ncbi.nlm.nih.gov). On obtient ainsi une identification accompagnée d'un pourcentage d'homologie qui, lorsqu'il est supérieur ou égal à 97%, permet d'identifier avec certitude la séquence d'intérêt.

c. PCR temps réel R72H

La PCR temps réel R72H nécessite les amorces Vp 32 (Forward, 5'-CGA ATC CTT GAA CAT ACG CAG C-3') et Vp 33 (Reverse, 5'-TGC GAA TTC GAT AGG GTG TTA ACC-3') et la sonde TaqMAN SVp 32-33 (FAM – CAC AGC AAG CGG GTA ATC TT – BBQ) (62,63), ciblant la séquence R72H spécifique à cette espèce. Tout comme pour la PCR du gène 16S rRNA, les extraits d'ADN des souches à identifier ont été déposés dans une plaque 96 puits avec le mélange réactionnel. Le volume final par puits était de 20 µL, dont 2 µL d'extraits d'ADN, 0,4 µL de chaque amorce à 50 µM (Sigma-Aldrich, L'Isle d'Abeau Chesnes, France), 0,2 µL de la sonde TaqMAN à 5 µM (Eurofins, Nantes, France), 10 µL d'un mélange MasterMix Quantitec probe PCR 2X (Qiagen) contenant les dNTP, le tampon de PCR et la Taq polymérase et 7 µL d'eau purifiée sans nucléase. La sonde TaqMAN est constituée d'un fluorophore, la 6-carboxyfluorescéine (FAM) en 5' et d'un désactivateur ou quencher en 3' (BlackBerry® Quencher 650 nm BBQ-650).

L'amplification de l'ADN a été réalisée grâce à un thermocycleur iCycler (Biorad, France). La réaction de PCR commence par une phase de dénaturation des double-brins d'ADN à 95°C pendant 10 minutes, suivie de la phase d'hybridation et d'élongation à 60°C pendant 1 minute, répétée 45 fois. Pendant le cycle les mélanges réactionnels sont soumis à une fluorescence d'excitation de 495 nm, ce qui correspond à la longueur d'onde d'absorption du fluorophore FAM. La fluorescence émise est lue à 517 nm. La réaction est accompagnée d'une gamme étalon d'ADN de *V. parahaemolyticus* extrait au laboratoire (de 10⁻¹ ng/µL à 10⁻⁵ ng/µL). Les réactions sont également accompagnées d'un contrôle négatif de réaction sans ADN et d'un contrôle négatif d'amplification avec de l'ADN non cible afin de tester la spécificité de la réaction.

IV. Antibiogrammes

Pour la réalisation des antibiogrammes, les souches, conservées à -80°C , sont décongelées et ensemencées sur GNS à 2% de NaCl puis incubées pendant 24h à 37°C . Ensuite, les colonies ont été suspendues dans de l'eau physiologique contenant 0,85% de NaCl et la suspension bactérienne a été ajustée de façon à obtenir une densité de 0,5 McFarland. La suspension obtenue a été étalée avec un écouvillon sur une gélose Mueller-Hinton. Les disques contenant les antibiotiques ont ensuite été déposés sur la gélose ensemencée qui est incubée pendant 16-18h à 35°C . La lecture a été faite grâce à un lecteur automatique de plaque Biomic (Giles Scientific) et les diamètres d'inhibition ont été ajustés manuellement. Chaque lecture était accompagnée d'un contrôle positif *Escherichia coli* ATCC 25922 qui a permis de valider la qualité du lot de MH utilisé, ainsi que la diffusion des antibiotiques dans la gélose Mueller-Hinton.

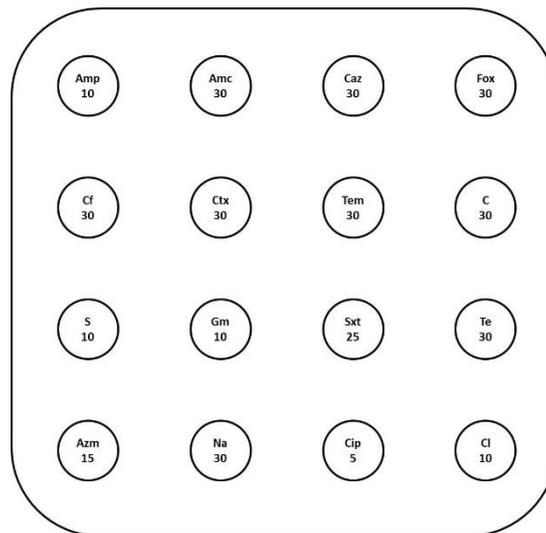


Figure 4 : Plan de la boîte d'antibiogramme pour *Vibrio parahaemolyticus*.

Amp : ampicilline (10 μg) ; Amc : amoxicilline-acide clavulanique (20/10 μg) ; Tem : témocilline (30 μg) ; Caz : ceftazidime (30 μg) ; Fox : cefoxitine (30 μg) ; Ctx : cefotaxime (30 μg) ; Cf : cefalotine (30 μg) ; Azm : azithromycine (15 μg) ; Na : acide nalidixique (30 μg) ; Cip : ciprofloxacine (5 μg) ; Cl : colistine (10 μg) ; Te : tétracycline (30 μg) ; Sxt : triméthoprime-sulfaméthoxazole (1,25/3,75 μg) ; S : streptomycine (10 μg) ; Gm : gentamicine (10 μg) et C : chloramphénicol (30 μg)

Seize antibiotiques critiques en santé humaine ou recommandés par le référentiel CLSI (2015) ont été choisis, de façon à mettre en évidence des résistances aux antibiotiques préconisés lors de la prise en charge thérapeutique (azithromycine et ciprofloxacine notamment), ainsi que des résistances aux grandes familles d'antibiotiques et éventuellement des résistances croisées (bêta-lactamase à spectre étendu par exemple): ampicilline (10 μg),

amoxicilline-acide clavulanique (20/10 μ g), témocilline (30 μ g), ceftazidime (30 μ g), cefoxitine (30 μ g), cefotaxime (30 μ g), cefalotine (30 μ g), azithromycine (15 μ g), acide nalidixique (30 μ g), ciprofloxacine (5 μ g), colistine (10 μ g), tétracycline (30 μ g), triméthoprime-sulfaméthoxazole (1,25/3,75 μ g), streptomycine (10 μ g), gentamicine (10 μ g) et chloramphénicol (30 μ g) (Figure 4).

V. Traitement statistique des données des antibiogrammes

Les diamètres d'inhibition ont été entrés dans un tableur Excel de façon à compiler les données souche par souche pour chaque antibiotique. Ces données ont été analysées et des histogrammes ont été construits de façon à mettre en évidence les phénotypes majoritaires et les phénotypes atypiques de résistance ou de sensibilité à un antibiotique donné. Cette interprétation des données vise à déterminer des critères d'interprétation afin de différencier les souches ayant des profils atypiques de la population normale. Elle s'est faite dans un premier temps par examen visuel des histogrammes comme recommandé par Hombach *et al.* (96) auquel s'est ajouté un traitement par le logiciel StatGraphics (Statpoint Technologies, Inc., Warrenpoint, USA) visant à appliquer une loi normale sur les données selon la technique NRI (97,98).

Résultats

I. Identification des souches bactériennes

Vingt-sept échantillons de produits de la pêche ont été analysés avant la réalisation de ces travaux par le personnel de l'unité B3PA de l'Anses, pour la recherche de *V. parahaemolyticus* selon la norme ISO/TS 21872. Entre 1 et 4 colonies par échantillon ont été prélevées (pour un total de 39 souches), isolées et stockées à -80°C.

Pour la réalisation de ces travaux, les souches ont été ensemencées à nouveau sur des milieux chromogènes (TCBS ou CHROMagar *Vibrio*). Vingt-six d'entre elles donnaient des colonies caractéristiques, de couleur mauve sur milieu CHROMagar *Vibrio* ou verte sur milieu TCBS (Tableau 3). Une première identification a ensuite été faite par des caractères biochimiques pour 30 souches (galerie API 20E). Dix-neuf d'entre elles ont été identifiées comme *V. parahaemolyticus*, et toutes avaient un aspect caractéristique sur les milieux chromogènes. Trois colonies mauves sur milieu CHROMagar *Vibrio* n'ont pas été identifiées comme *V. parahaemolyticus* par galerie API 20E. Une était un *V. vulnificus* et les deux autres étaient des *V. mimicus*. Une colonie verte sur milieu TCBS a été identifiée comme *V. cholerae*. Concernant les autres colonies non caractéristiques sur les milieux chromogènes identifiées par ensemencement d'une galerie API 20E, 5 étaient des *V. cholerae*, une était un *V. alginolyticus* et une était un *Aeromonas hydrophila*.

Après extraction de l'ADN de 33 souches, des PCR sur le gène 16S ont été réalisées pour affiner et/ou confirmer l'identification bactérienne. Vingt-sept souches ont été identifiées comme *Vibrio sp.*, 2 souches comme *V. parahaemolyticus*, 2 comme *V. metschnikovii*, 2 comme *Proteus sp.* et une comme *V. cholerae*. La PCR sur le gène 16S rRNA a permis une identification au niveau du genre bactérien et plus rarement au niveau de l'espèce bactérienne. Une des deux souches identifiées comme *V. parahaemolyticus* était mauve et l'autre était bleue sur le milieu CHROMagar *Vibrio*. Les deux souches ayant été identifiées comme *Proteus sp.* avaient un aspect caractéristique de *V. parahaemolyticus* sur milieu chromogène CHROMagar (colonies mauves)

L'identification des souches bactériennes a été complétée en réalisant une PCR sur la séquence R72H pour confirmer l'espèce *V. parahaemolyticus*. Au total, vingt-trois souches ont

été identifiées comme *V. parahaemolyticus*, dont 21 donnaient des colonies caractéristiques sur les milieux chromogènes TCBS ou CHROMagar *Vibrio*. Les deux autres souches identifiées comme des *V. parahaemolyticus* donnaient des colonies blanches ou bleutées non caractéristiques sur milieu CHROMagar. Plusieurs faux-positifs ont été observés puisqu'en plus des 21 souches de *V. parahaemolyticus*, 5 autres souches ont fait des colonies caractéristiques sur les milieux chromogènes. Une était un *V. cholerae* (vert sur milieu TCBS), une était un *V. vulnificus*, deux étaient des *V. mimicus* et une était un *Proteus spp.* dont l'espèce n'a pas pu être déterminée avec précision (mauve sur milieu CHROMagar *Vibrio*).

Les 23 souches, dont l'identification en tant que *V. parahaemolyticus* a été confirmée, ont été ajoutées à un panel de 225 souches isolées précédemment lors de prestations analytiques ou collectées au laboratoire dans sa fonction de LNR *Vibrio*. La résistance aux antibiotiques de ces souches bactériennes (248 au total) a ensuite été étudiée.

Tableau 3 : Isolement sur milieu gélosé et identification des souches bactériennes par galerie API 20E et/ou par PCR 16S et/ou par PCR R72H ; ND : Non Déterminé ; + : Identification de *V. parahaemolyticus*

Número de la souche	Milieu d'isolement et couleur de la colonie	Identification par galerie API 20E (score)	Identification par PCR 16S (homologie)	Identification par PCR R72H
12-4054	CHROMagar/Mauve	<i>V. parahaemolyticus</i> (99,9%)	<i>Vibrio sp.</i> (97%)	+
13-615	CHROMagar/Mauve	<i>V. parahaemolyticus</i> (99,9%)	<i>Vibrio sp.</i> (98%)	+
13-1876	CHROMagar/Mauve	<i>V. parahaemolyticus</i> (99,9%)	<i>Vibrio sp.</i> (97%)	+
13-1968	CHROMagar/Mauve	<i>V. parahaemolyticus</i> (99,9%)	<i>Vibrio sp.</i> (96%)	+
13-3038	CHROMagar/Mauve	<i>V. parahaemolyticus</i> (99,9%)	<i>Vibrio sp.</i> (97%)	+
14-1029 M1	CHROMagar/Mauve	ND	<i>V. parahaemolyticus</i> (98%)	+
14-1029 M4	1 CHROMagar/Mauve	<i>V. parahaemolyticus</i> (99,9%)	<i>Vibrio sp.</i> (98%)	+
	2 CHROMagar/Mauve	ND	<i>Proteus penneri</i> / <i>Proteus vulgaris</i> (98%)	ND
	3 CHROMagar/Bleue	ND	<i>Proteus penneri</i> / <i>Proteus vulgaris</i> (98%)	ND
14-1029 M3	CHROMagar/Mauve	<i>V. parahaemolyticus</i> (92,5%)	<i>Vibrio sp.</i> (98%)	+
15-177 J4	CHROMagar/Bleutée	<i>V. cholerae</i> (94,6%)	<i>V. parahaemolyticus</i> (97%)	+
15-0709 B2	1 CHROMagar/Mauve	ND	<i>Vibrio sp.</i> (97%)	+
	2 CHROMagar/Bleue	ND	<i>V. metschnikovii</i> (98%)	ND
15-1556	1 CHROMagar/Bleue	<i>V. cholerae</i> (74,5%)	<i>Vibrio sp.</i> (98%)	ND
	2 TCBS/Vert	<i>V. parahaemolyticus</i> (99,9%)	<i>Vibrio sp.</i> (97%)	+
15-1300	1 CHROMagar/Mauve	<i>V. parahaemolyticus</i> (99,9%)	<i>Vibrio sp.</i> (96%)	+
	2 CHROMagar/Bleue	ND	<i>Vibrio metschnikovii</i> (98%)	ND
15-1555	CHROMagar/Blanche	ND	<i>Vibrio sp.</i> (98%)	ND
15-1771	CHROMagar/Mauve	<i>V. parahaemolyticus</i> (99,9%)	<i>Vibrio sp.</i> (98%)	+
15-1770	CHROMagar/Blanche	<i>V. cholerae</i> (74,5%)	<i>Vibrio sp.</i> (97%)	ND
	TCBS/Vert	<i>V. parahaemolyticus</i> (99,9%)	ND	+
15-1580	1 TCBS/Jaune	ND	<i>V. cholerae</i> (99%)	ND
	2 CHROMagar/Blanche	<i>V. cholerae</i> (74,5%)	<i>Vibrio sp.</i> (98%)	ND
	3 CHROMagar/Mauve	<i>V. vulnificus</i> (93,9%)	<i>Vibrio sp.</i> (96%)	ND
	4 CHROMagar/Blanche	<i>Aeromonas hydrophila</i> (87,1%)	<i>Vibrio sp.</i> (98%)	ND
15-1662	1 TCBS/Jaune	<i>V. cholerae</i> (99,9%)	ND	ND
	2 TCBS/Vert	<i>V. parahaemolyticus</i> (98,5%)	ND	+
15-1932	1 TCBS/Vert	<i>V. cholerae</i> (99,9%)	ND	ND
	2 TCBS/Vert	<i>V. parahaemolyticus</i> (99,9%)	ND	+
15-2001 M 6h	CHROMagar/Mauve	<i>V. parahaemolyticus</i> (99,9%)	<i>Vibrio sp.</i> (98%)	+
16-0007	CHROMagar/Mauve	<i>V. parahaemolyticus</i> (99,9%)	<i>Vibrio sp.</i> (98%)	+
16-0107	CHROMagar/Blanche	<i>V. alginolyticus</i> (56,9%)	<i>Vibrio sp.</i> (97%)	ND
16-0113	CHROMagar/Blanche	ND	<i>Vibrio sp.</i> (89%)	+
16-0155	1 CHROMagar/Mauve	<i>V. mimicus</i> (71%)	<i>Vibrio sp.</i> (97%)	ND
	2 CHROMagar/Mauve	<i>V. parahaemolyticus</i> (92,5%)	<i>Vibrio sp.</i> (98%)	+
16-0159	1 CHROMagar/Mauve	<i>V. mimicus</i> (68,8%)	<i>Vibrio sp.</i> (97%)	ND
	2 CHROMagar/Mauve	<i>V. parahaemolyticus</i> (99,9%)	<i>Vibrio sp.</i> (99%)	+
16-0160	CHROMagar/Mauve	<i>V. parahaemolyticus</i> (99,9%)	ND	+
16-0192	CHROMagar/Mauve	<i>V. parahaemolyticus</i> (99,9%)	<i>Vibrio sp.</i> (99%)	+

II. Antibiogrammes des souches de *Vibrio parahaemolyticus*

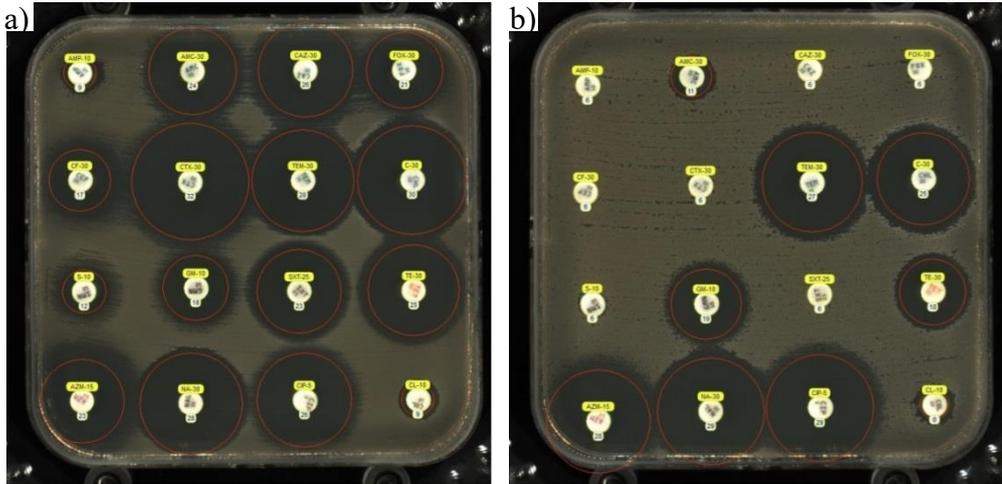


Figure 5 : Exemples d'antibiogrammes obtenus sur milieu Mueller-Hinton a) Souche 15-2013 ; b) Souche 16-0006.

Les antibiogrammes ont été réalisés sur un panel 248 souches de *V. parahaemolyticus* isolées de produits de la pêche, dont les 23 souches identifiées précédemment.

Des résistances et des sensibilités différentes en fonction des antibiotiques et des souches ont été observées (Figure 5). Les cercles rouges correspondent aux diamètres d'inhibition déterminés par le lecteur de plaque et ajustés manuellement. Les diamètres d'inhibition obtenus pour les 16 antibiotiques testés sur chacune des 248 souches de *V. parahaemolyticus* ont été analysés pour mettre en évidence la distribution des profils de résistance des souches (Figure 6). La population normale pour une espèce bactérienne par rapport à un antibiotique correspond à la proportion de la population la plus importante en fonction des diamètres d'inhibition. Les souches qui avaient un diamètre d'inhibition significativement différent de ceux de la population normale étaient considérées comme atypiques. Sur les graphiques (Figure 6), les souches avec un profil atypique correspondent aux pics marqués en rouge sortant de la distribution normale des diamètres d'inhibition.

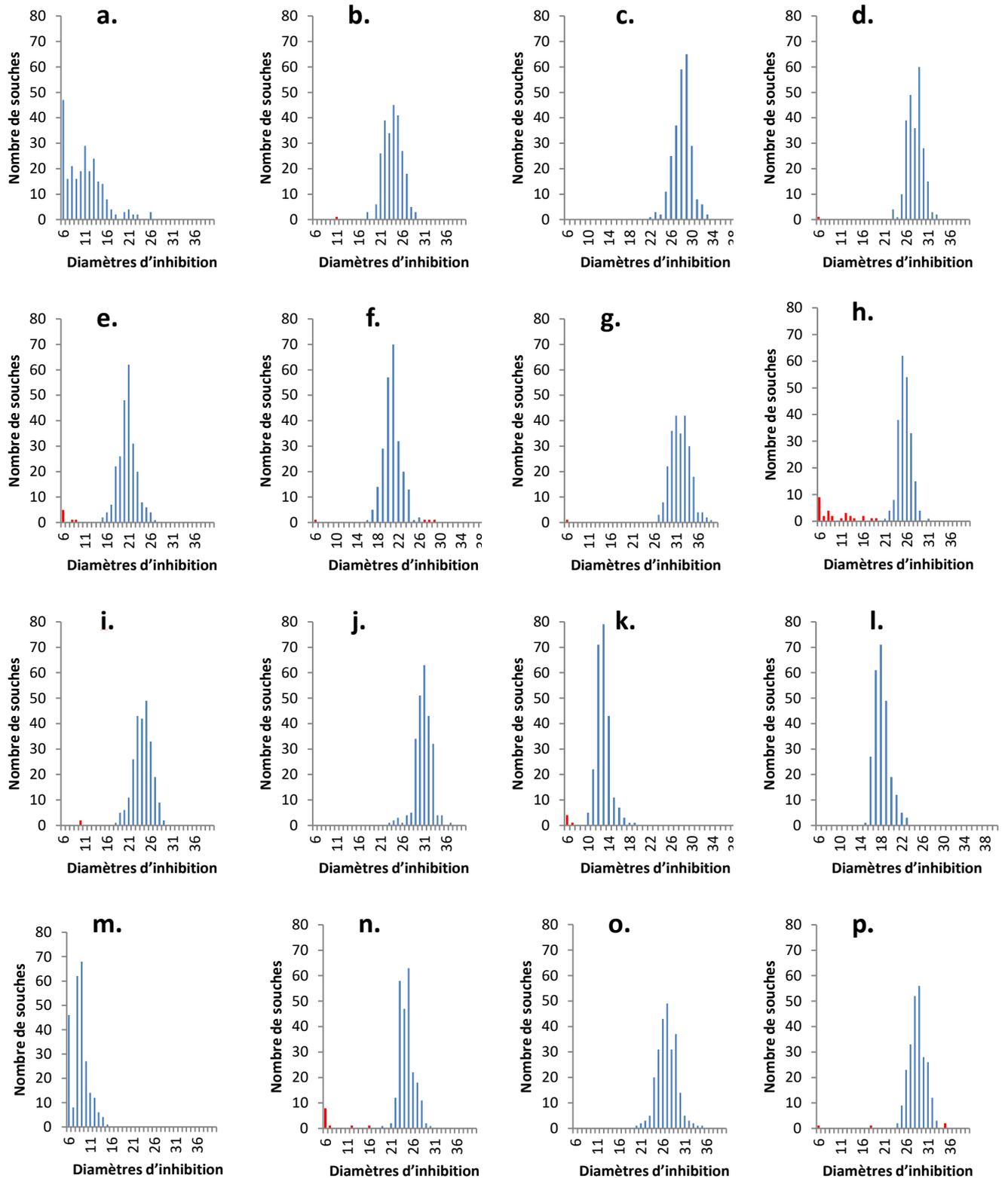


Figure 6 : Distribution des diamètres d'inhibition (en mm) par antibiotique mesurées pour 248 souches de *Vibrio parahaemolyticus*.
a : Ampicilline ; **b** : Amoxicilline-acide clavulanique ; **c** : Témocilline ; **d** : Ceftazidime ; **e** : Céfalocone ; **f** : Céfoxitine ;
g : Céfotaxime ; **h** : Tétracycline ; **i** : Azithromycine ; **j** : Chloramphénicol ; **k** : Streptomycine ; **l** : Gentamicine ; **m** : Colistine ;
n : Cotrimoxazole ; **o** : Ciprofloxacine ; **p** : Acide nalidixique

Les critères d'interprétation permettant de déterminer les populations normales sont regroupés dans le Tableau 4. Les critères du CLSI ont été déterminés pour des souches cliniques, or les souches étudiées sont des souches alimentaires ou environnementales, et donc potentiellement plus sensibles aux antibiotiques. En comparant nos critères d'interprétation à ceux du référentiel CLSI (2015), nous avons observé que les souches analysées étaient en majorité cliniquement sensibles aux antibiotiques. La limite basse des critères du CLSI correspond globalement à la limite haute des diamètres observés. Pour 6 antibiotiques (la témocilline, la céfalotine, l'azithromycine, la streptomycine, la colistine et l'acide nalidixique) le CLSI ne donne pas de critères d'interprétation. Il donne également des critères d'interprétation pour l'ampicilline alors que l'étude de nos histogrammes ne permet pas de déterminer visuellement un diamètre moyen qui pourrait correspondre à une CMI critique.

En observant les populations atypiques, on observe que certaines souches sont, selon les critères déterminés pour des souches cliniques, résistantes à la tétracycline et au cotrimoxazole. D'autres résistances phénotypiques existent (céfalotine, azithromycine, céfoxitine, céfotaxime, streptomycine, acide nalidixique) mais en l'absence de critères correspondant il n'a pas été possible de déterminer si ces faibles diamètres mesurés sont cliniquement pertinents ou non.

Tableau 4 : Critères d'interprétation permettant de déterminer les populations normales et les critères d'interprétation du CLSI (2015) pour les souches de *Vibrio*;

Antibiotique	Diamètres observés (mm)	Critères du CLSI 2015 (mm) $R \leq I \leq S$
Ampicilline	ND	13 – 17
Amoxicilline-acide clavulanique	18 - 29	13 – 18
Témocilline	22 - 33	ND
Ceftazidime	21 - 33	17 – 21
Céfalotine	15 - 27	ND
Céfoxitine	16 - 26	14 – 18
Céfotaxime	27 - 39	22 – 26
Tétracycline	21 - 31	11 – 15
Azithromycine	18 - 29	ND
Chloramphénicol	23 - 37	12 – 18
Streptomycine	10 - 19	ND
Ciprofloxacine	20 - 35	12 – 16
Colistine	6 - 15	ND
Cotrimoxazole	19 - 30	10 – 16
Gentamicine	15 - 23	12 – 15
Acide nalidixique	24 - 33	ND

ND : non déterminé

Les populations normales regroupaient 100% des souches dans la zone des diamètres critiques indiqués par le CLSI pour la témocilline, le chloramphénicol, la ciprofloxacine, la colistine et la gentamicine, 99,6% des souches (247/248 souches) pour la ceftazidime, l'amoxicilline-acide clavulanique et le céfotaxime, 99,2% des souches pour l'azithromycine (246/248), 98,4% des souches pour l'acide nalidixique et la céfoxitine (244/248), 98% des souches pour la streptomycine (243/248), 97,2% des souches pour la céfalotine (241/248), 95,6% des souches pour le cotrimoxazole (237/248) et 88,7% des souches pour la tétracycline (220/248). Par ailleurs, dans le cas de l'ampicilline, la distribution des diamètres d'inhibition empêchait de dégager un phénotype normal et donc de déceler de véritables modifications de sensibilité.

Les antibiotiques pour lesquels des souches ont montré des caractères atypiques sont la ceftazidime (1 souche sur 248 ; 0,4%), l'amoxicilline-acide clavulanique (1/248 ; 0,4%), le céfotaxime (1/248 ; 0,4%), l'azithromycine (2/248 ; 0,8%), l'acide nalidixique (4/248 ; 1,6% dont deux plus sensibles, diamètre d'inhibition supérieur à 33 mm), la céfoxitine (4/248 ; 1,6% dont trois plus sensibles, diamètre d'inhibition supérieur à 26 mm), la streptomycine (5/248, 2%), la céfalotine (7/248 ; 2,8%), le cotrimoxazole (11/248 ; 4,4%) et la tétracycline (28/248 ;

11,3%). On note un très grand nombre de souches résistantes à la tétracycline (28 souches) ainsi qu'au cotrimoxazole (11 souches). La résistance à ces deux antibiotiques est très souvent associée puisque 10 des 11 souches résistantes au cotrimoxazole sont aussi résistantes à la tétracycline.

Parmi les souches avec un profil atypique, seules cinq sur 39 ont une sensibilité plus importante à un antibiotique, trois concernent la céfoxitine et deux l'acide nalidixique. Parmi les 39 souches qui ont un profil atypique, on note plusieurs multi-résistances (Figure 7). La souche 16-0263 présentait quatre résistances atypiques aux antibiotiques testés : l'acide nalidixique, la tétracycline, le cotrimoxazole et la streptomycine. La souche 16-0006 montrée précédemment (Figure 5) avait 8 résistances atypiques à la tétracycline, au cotrimoxazole, à la streptomycine et à toutes les bêta-lactamines, à l'exception de la témocilline.

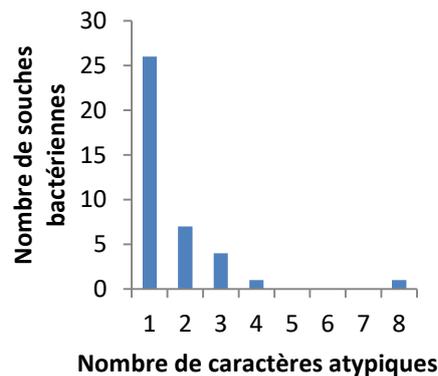


Figure 7 : Souches bactériennes de *V. parahaemolyticus* classées en fonction du nombre de caractères atypiques

Concernant l'origine des souches étudiées, 180 souches sur 248 ont été isolées de crevettes. Sur ces 180 souches, 32 (17,8%) ont un profil atypique. Ce ratio est supérieur à celui des autres matrices (gambas : 1/17 ; poisson : 1/7 ; inconnue : 1/43).

Les souches ayant un profil atypique provenaient en grande majorité de crevettes (32/39 ; 82%) mais sont souvent d'origine géographique inconnue (24/39 ; 61,5%). On observe que les souches ayant des résistances à 4 ou 8 antibiotiques proviennent de crevettes (Figure 8).

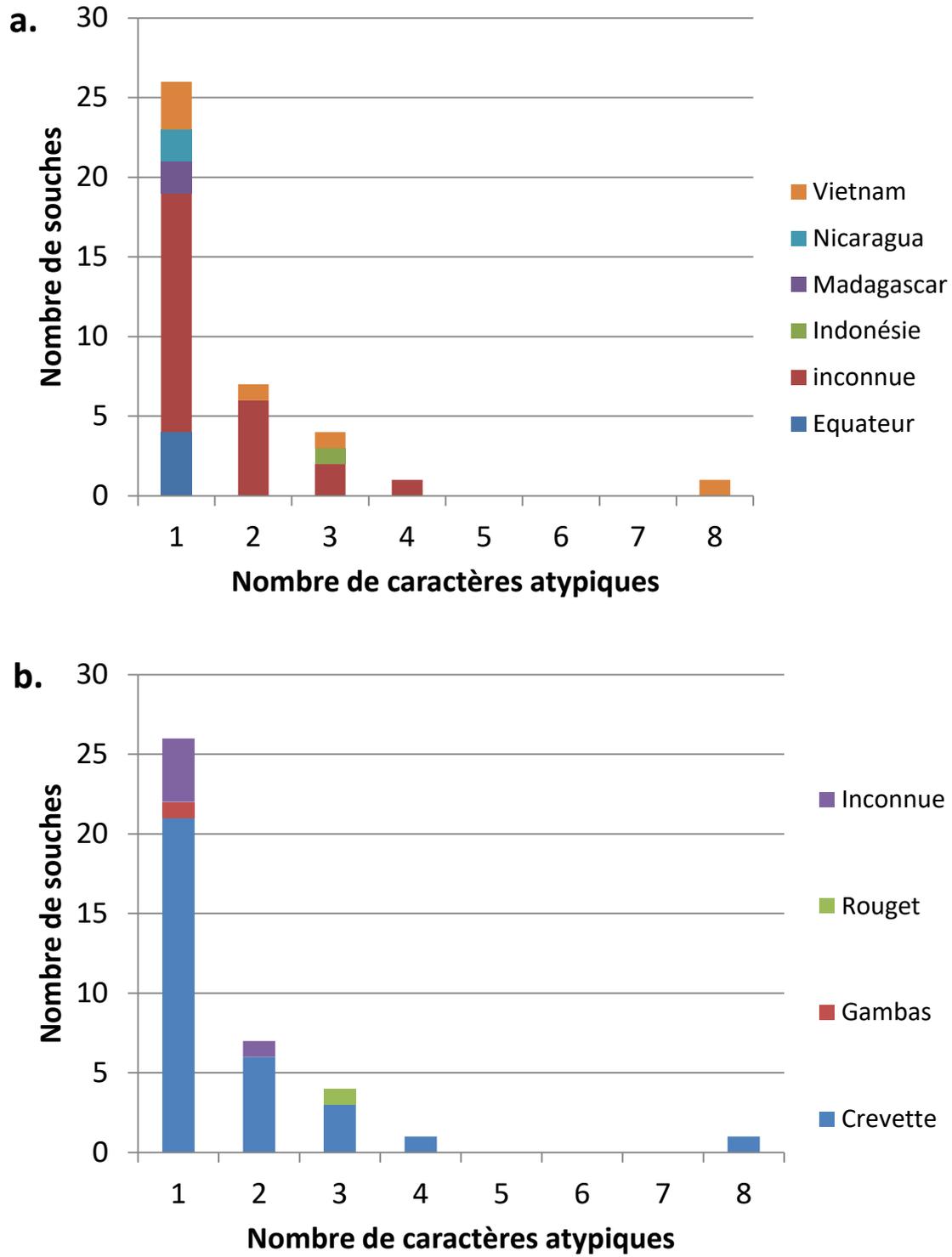


Figure 8 : Répartition des origines (a.) géographiques et (b.) alimentaires des souches de *Vibrio parahaemolyticus* ayant un profil atypique.

Discussion

La recherche de *V. parahaemolyticus* dans les échantillons de produits de la mer a nécessité des isolements sur différents milieux sélectifs puis l'identification des souches isolées par des techniques biochimiques et de biologie moléculaire. Sur les 39 souches analysées, 23 souches ont été identifiées comme *V. parahaemolyticus*. Deux d'entre elles étaient des faux négatifs puisqu'elles donnaient des colonies blanches ou bleutées non caractéristiques sur milieu CHROMagar. Cinq autres souches étaient des faux positifs puisqu'elles donnaient des colonies caractéristiques de *V. parahaemolyticus* sur les milieux chromogènes. Une était un *V. cholerae* (vert sur milieu TCBS), une était un *V. vulnificus*, deux étaient des *V. mimicus* et une était un *Proteus spp.*, dont l'espèce n'a pas pu être déterminée avec précision (mauve sur milieu CHROMagar *Vibrio*).

Ces données rejoignent les travaux de Di Pinto *et al.* (99) évaluant la pertinence de l'utilisation de ces milieux pour isoler *V. parahaemolyticus*. En ensemençant les deux types de milieux (CHROMagar *Vibrio* et TCBS) avec 47 échantillons contaminés, il a été observé 2 faux positifs et 43 faux négatifs sur milieu TCBS, et 6 faux négatifs sur milieux CHROMagar *Vibrio*. Les deux types de milieux chromogènes semblaient donc présenter des imprécisions, avec une fiabilité plus importante du milieu CHROMagar *Vibrio*. Fabbro *et al.* (100) ont observé des résultats similaires puisque seules 58% des colonies caractéristiques retenues sur milieu TCBS avaient été confirmées comme *V. parahaemolyticus* par des méthodes biochimiques. De même, Ghenem *et al.* (101) concluaient de leur étude que le milieu TCBS n'était pas assez sélectif pour identifier avec certitude des *V. parahaemolyticus* et que d'une façon plus générale, l'identification de *V. parahaemolyticus* ne pouvait être confirmée par des méthodes de microbiologie.

La norme ISO/TS 21872, qui demande l'utilisation des deux milieux TCBS et CHROMagar *Vibrio* pour l'isolement de *Vibrio* pathogènes dans les produits alimentaires est actuellement en révision et pose la question de la pertinence de l'utilisation conjointe de ces deux milieux.

Consécutivement à l'isolement des souches bactériennes sur les milieux chromogènes, des tests biochimiques ont été réalisés (galerie API 20E). Les 19 souches identifiées *V.*

parahaemolyticus par galerie API 20E ont été confirmées par PCR R72H. Un faux-négatif en plus a été noté, une souche identifiée *V. cholerae* (94,5%) par galerie API 20E et positive comme *V. parahaemolyticus* à la PCR R72H. Il a déjà été observé que la sensibilité des galeries API 20E pouvait poser problème dans une étude au cours de laquelle 7 faux-négatifs ont été observés sur 21 souches testés, avec une sensibilité de 67% (100). Il semblerait que cette faible sensibilité soit due aux conditions d'incubation des galeries qui pourraient ne pas correspondre aux conditions de culture idéales de *V. parahaemolyticus*, ce qui pourrait inhiber l'expression de certaines voies métaboliques (61). Ce problème semble pouvoir être contourné par l'inoculation des galeries avec des suspensions bactériennes enrichies en sels (3% de NaCl), ce qui correspondrait mieux aux conditions de cultures idéales de *V. parahaemolyticus* (100).

Les souches isolées sur milieux chromogènes ont ensuite été analysés par biologie moléculaire. La PCR sur le gène 16S rRNA a permis d'identifier 26 souches sur 33 au niveau du genre bactérien. Les 5 autres souches ont été identifiées au niveau de l'espèce (leur séquence a > 97% d'homologie avec la séquence de la souche de référence) : *V. parahaemolyticus* (2 souches), *V. cholerae* (1 souche), *V. metschnikovii* (2 souches). Il semble donc difficile d'identifier les espèces de *Vibrio* à partir d'une flore totale grâce à la PCR sur le gène 16S. Il a même été observé que cette identification pouvait être fautive au niveau du genre puisque que cette méthode pouvait confondre les genres *Aeromonas* et *Vibrio* (102). En plus de la PCR sur le gène 16S, réaliser d'autres tests tels que l'ensemencement de galeries API 20E, une PCR ciblant des gènes de ménage ou une PCR ciblant la séquence R72H permettraient d'améliorer l'identification de *V. parahaemolyticus*.

Devant les imprécisions des méthodes de microbiologie et de biochimie, le meilleur moyen d'identifier *V. parahaemolyticus* semble donc être l'utilisation de méthodes de biologie moléculaire. La PCR R72H par exemple cible une séquence spécifique chez *V. parahaemolyticus*. Elle permet de confirmer l'identification de souches après orientation du diagnostic microbiologique mais ne permet pas d'identifier une souche inconnue, seulement de savoir si une souche d'intérêt est ou pas un *V. parahaemolyticus* (62,63). Le gène *toxR* peut également être amplifié puis séquencé pour identifier l'espèce, puisqu'il est présent chez toutes les espèces de *Vibrio* et permet de les discriminer grâce à sa faible homologie d'une espèce à l'autre (61).

Une fois l'identification des souches comme *V. parahaemolyticus* confirmée, les antibiogrammes ont pu être réalisés.

Le choix des antibiotiques composant l'antibiogramme a été décidé avant l'étude. Ils comprennent des antibiotiques critiques en santé humaine et certains antibiotiques recommandés par le CLSI pour l'étude de l'antibiorésistance chez *V. parahaemolyticus*. Les molécules utilisées pour le traitement des « *Vibrioses* » à *V. parahaemolyticus* sont les fluoroquinolones telles que la ciprofloxacine, ainsi que la tétracycline dans certains cas et l'azithromycine dans le cadre des diarrhées du voyageur, comme recommandé par le CDC (Center for Disease Control and Prevention) (92). Il paraît donc intéressant d'étudier les profils de résistance à ces antibiotiques, et plus particulièrement pour ce qui est de l'azithromycine qui a fait l'objet de nombreux mésusages, conduisant à une augmentation du nombre de bactéries résistantes (103). Les autres molécules testées représentent les grandes familles d'antibiotiques : pénicillines (ampicilline, amoxicilline-acide clavulanique, témocilline), céphalosporines (ceftazidime, céfalotine, céfoxitine et céfotaxime), aminosides (streptomycine et gentamicine), chloramphénicol, colistine et les sulfamides avec l'association cotrimoxazole. En l'absence de profils de résistance intrinsèque décrits par les référentiels, il semble intéressant de déterminer les populations avec des profils normaux et celles avec des profils atypiques parmi des souches alimentaires.

En l'absence de critères interprétatifs de référence il est difficile d'établir des limites strictes et fiables pour déterminer les populations résistantes et sensibles à un antibiotique. C'est pourquoi dans cette étude ces populations ont été déterminées par analyses statistiques en confrontant les différents diamètres d'inhibition. L'objectif est de pouvoir compléter des référentiels souvent incomplets.

L'étude de la distribution de la résistance à l'ampicilline ne semble pas être pertinente dans la mesure où aucune population majoritaire n'a pu être identifiée. Les diamètres d'inhibition s'étalent de 6 à 26 mm sans que l'on puisse déterminer des critères d'interprétation. Les variations de résistance à cet antibiotique chez *V. parahaemolyticus* a déjà été observée notamment par Han *et al.* (104) lors d'une étude portée sur des souches prélevées dans des huîtres aux Etats-Unis. Sur 252 souches analysées, 95 étaient résistantes et 41 étaient

intermédiaires vis-à-vis de l'ampicilline d'après les critères CLSI (105) pour les antibiogrammes par la méthode de dilution, soit un total de 54% de souches non sensibles. Un fort taux de résistance à l'ampicilline avait été rapporté dès 1979 par Blake *et al.* (106). La résistance à l'ampicilline chez *V. parahaemolyticus* est conférée par les pénicillinases de type *ampC*, fréquemment retrouvées dans les souches issues de l'environnement (107). Le nombre élevé de variation des profils de résistance à l'ampicilline semble rendre compliquée la détermination d'un phénotype normal.

La témocilline a été choisie car c'est un antibiotique de la famille des bêta-lactamines non hydrolysée par les bêta-lactamases des entérobactéries (BLSE, AmpC...). L'inhibition de son activité ne peut se faire que par la production d'une carbapénèmase de type métallo-bêta-lactamase (108), en particulier la carbapénèmase de type OXA-48 qui est très résistante à la témocilline. Aucune souche résistante à la témocilline n'a été observée, ce qui est concordant avec les données bibliographiques puisqu'au moment de l'analyse de ces données, aucune carbapénèmase n'avait été décrite chez *V. parahaemolyticus*. Cependant Mangat *et al.* (70) ont décrit chez *V. cholerae* une carbapénèmase appelée VCC-1 codée par le gène *bla_{VCC-1}*. Par ailleurs, une carbapénèmase *bla_{NDM-1}* a été retrouvée chez *V. cholerae*, conférant des résistances aux céphalosporines de troisième génération (68). Ces études posent la question de la dissémination de ce gène dans l'environnement bien qu'il soit pour l'instant restreint au chromosome de *V. cholerae*. Il est cependant possible que de gènes de résistances aux carbapénèmes puissent être acquis par *V. parahaemolyticus* étant donné la proximité phylogénétique entre les deux espèces (69).

Concernant les céphalosporines, la souche de *V. parahaemolyticus* 16-0006 était résistante aux quatre molécules testées. Cinq autres souches ont été trouvées résistantes à la céfalotine, ce qui semble cohérent dans la mesure où cette molécule est une céphalosporine de première génération couvrant un spectre bien moins large que les molécules des générations plus récentes. La résistance aux céphalosporines chez *V. parahaemolyticus* est rare mais a déjà été décrite, notamment par Li *et al.* (67). Cette étude a mis en évidence l'existence d'une bêta-lactamase de type AmpC codée par le gène *bla_{CMY-2}* et d'une bêta-lactamase à spectre étendu (BLSE) codée par le gène *bla_{PER-1}* chez des souches de *V. parahaemolyticus* isolées de produits alimentaires chinois. Le gène *bla_{CMY-2}* était porté par le plasmide IncA/C qui est normalement un plasmide conjugatif des *Enterobacteriaceae* (109), signe que les *Vibrio* peuvent acquérir des plasmides d'autres espèces, et le gène *bla_{PER-1}* est normalement porté par un plasmide de type

IncN (110). Ces deux enzymes confèrent des résistances aux céphalosporines de troisième, voire quatrième, génération et pourraient être à l'origine de la multi-résistance décrite dans ces travaux.

Une résistance à l'amoxicilline-acide clavulanique a été observée chez la souche 16-0006. Ce type de résistance a déjà été décrit chez *V. cholerae* par Bier *et al.* (111). Les souches de *V. cholerae* étudiées étaient résistantes aux pénicillines et aux carbapénèmes mais pas aux céphalosporines de troisième génération. Le gène responsable n'a pas été identifié mais leur conclusion indiquait qu'une carbapénémase était suspectée. Il semble plus probable que la résistance à l'amoxicilline-acide clavulanique observée pour la souche 16-0006 soit due à une céphalosporinase, ces molécules étant résistantes aux inhibiteurs de bêta-lactamases.

L'antibiotique auquel le plus grand nombre de souches bactériennes étaient résistantes était la tétracycline (28/248 souches). La distribution des diamètres d'inhibition de cet antibiotique permet de bien séparer les souches résistantes et les souches sensibles. Cette résistance a été décrite chez *V. parahaemolyticus*, notamment par Letchumanan *et al.* (112). Dans cette étude, 17% des souches testées issues de crevettes étaient résistantes à la tétracycline d'après le référentiel du CLSI (113). Le ou les gènes responsables de la résistance à la tétracycline n'avaient pas été recherchés. Une autre étude portant sur des souches isolées dans des fermes aquacoles au Japon a décrit des résistances à la tétracycline dues aux gènes *tetB*, *tetC*, *tetD*, *tetG*, et *tetY* (114).

Concernant l'azithromycine, deux souches résistantes ont été observées. La résistance à l'azithromycine n'a pas été rapportée chez *V. parahaemolyticus* mais a été décrite chez des *V. cholerae*, notamment des souches pathogènes de type O1 (115). Ces souches ont été isolées dans un hôpital indien chez des patients dont on suspectait qu'ils étaient atteints de choléra. Chez *V. cholerae*, il a été observé que des gènes de résistances aux macrolides tels que *mphR*, *mrx*, *mph(K)*, *mel* et *mph2* étaient portés par le plasmide IncA/C (116). Néanmoins, la sur-prescription d'azithromycine dans les cas de diarrhées transitoires pourrait conduire à l'émergence de résistances qui n'ont potentiellement pas encore été décrites.

Parmi les souches étudiées, cinq étaient résistantes à la streptomycine dont la souche 16-0006, 11 étaient résistantes au cotrimoxazole et deux étaient résistantes à l'acide nalidixique. La résistance à la streptomycine chez *V. parahaemolyticus* est un phénomène déjà retrouvé par Shaw *et al.* (117) dans des souches issues de prélèvements d'eau aux Etats-Unis et surtout en Inde par Sudha *et al.* (118) dans une étude au cours de laquelle 89% des souches de *V. parahaemolyticus* et de *V. vulnificus* analysées ont montré une résistance à la streptomycine. Des gènes responsables de la résistance à la streptomycine ont été trouvés chez *V. parahaemolyticus* (66). Il s'agit des gènes *strA* et *strB*. Cette étude a également décrit deux résistances au cotrimoxazole, portées par le gène *sul2*. La résistance à l'acide nalidixique chez *V. parahaemolyticus* est due à un homologue des gènes de résistance aux quinolones *qnr*, la séquence VPA0095. Cette séquence est probablement dérivée du gène *qnrA* présent chez les Entérobactéries (119).

Les souches de *V. parahaemolyticus* étudiées sont résistantes à la colistine. Très peu d'études portent sur la résistance de *V. parahaemolyticus* à la colistine, et la plupart d'entre elles s'appuient sur des référentiels ne prenant pas en compte cette espèce ou cet antibiotique, ce qui empêche de corréler les résultats obtenus avec des données bibliographiques. Parmi ces études, Sudha *et al.* (118) ont observé 95% de résistance à la colistine et 100% de résistance à l'ampicilline chez *V. parahaemolyticus*, en s'appuyant sur des critères interprétatifs fournis par le fabricant des disques contenant les antibiotiques. Ces critères définissent la limite entre la résistance et la sensibilité à la colistine à 10 mm pour les *Enterobacteriaceae* et pour *Pseudomonas aeruginosa*. De même pour l'ampicilline, l'interprétation indiquée est différente en fonction de l'espèce étudiée mais aucun critère ne concerne *V. parahaemolyticus*, ce qui pose la question de la référence prise en compte pour interpréter les résultats (HiMedia Laboratories, 2012). Ces problèmes d'interprétation sont retrouvés dans la plupart des études portant sur l'antibiorésistance chez *V. parahaemolyticus*.

L'acquisition par les bactéries de gènes de résistance aux antibiotiques peut se faire via le transfert d'éléments génétiques mobiles (EGM) portant plusieurs gènes associés. Les bactéries peuvent ainsi acquérir des résistances à plusieurs antibiotiques grâce à un seul EGM. Ainsi, un plasmide portant un intégron de classe 1 a été décrit chez *V. parahaemolyticus* (120). Cet intégron contenait les gènes *bla_{VEB-2}*, *aadB*, *arr2*, *cmlA*, *bla_{OXA-10}*, *aadA1* et *sul1*. L'analyse

de la séquence de cet intégron et de son environnement génétique a révélé qu'il possédait une forte similitude avec des intégrons trouvés chez *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*. Ce résultat semble montrer que cet intégron peut être transféré horizontalement d'une espèce à l'autre. Sur le plasmide a également été identifiée une région de « multidrug-resistance » contenant les gènes *floR*, *tetA*, *tetR*, *strA* et *strB* ainsi que la cassette *qnrVC4*.

Le plasmide portant l'intégron présentait une très forte homologie avec un plasmide de multi-résistance décrit chez *V. cholerae*. Il semblerait donc possible qu'il ait été transféré chez *V. parahaemolyticus* à partir d'une souche de *V. cholerae*.

De la même façon, d'autres EGM portant des gènes de résistance ont été décrits chez *V. parahaemolyticus*, tels que présentés par Liu *et al.* en 2013 (121) avec un plasmide portant des bêta-lactamases à spectre étendu ainsi que d'autres gènes de résistance aux antibiotiques (*dfrA1*, *qnrVC*, *aacA3*, *aadA1*, *bla_{PER-1}*) et notamment des séquences d'insertions et des intégrases à proximité de cette région de « multidrug resistance ».

Des éléments similaires ont été décrits chez *V. cholerae*, avec notamment la description d'un élément mobile contenant les gènes *sul2*, *strA*, *strB*, *dfrA18* et *floR* ainsi que d'un intégron de classe 1 contenant les gènes *sul1* et *qncEA1* (122). Etant donné la possibilité qu'ont *V. cholerae* et *V. parahaemolyticus* à échanger des informations génétiques, la présence chez l'une des espèces d'éléments mobiles a un intérêt pour l'étude de la résistance aux antibiotiques chez d'autres espèces de *Vibrio*.

Conclusion et perspectives

Si l'on prend en compte le panel de souches de *V. parahaemolyticus* testées, une sensibilité à tous les antibiotiques testés à l'exception de l'ampicilline et de la colistine a été observée. Les molécules utilisées en thérapeutique, telles que l'azithromycine, la ciprofloxacine et la tétracycline demeurent globalement efficaces sur la plupart des souches testées.

Cette étude a permis de mettre en évidence 39 souches atypiques sur 248 souches étudiées, dont une souche multi-résistante (8 profils de résistances supérieures à la moyenne). L'augmentation du nombre de bactéries résistantes aux antibiotiques, ainsi que la capacité de *V. parahaemolyticus* à intégrer des plasmides pouvant porter des gènes de résistance et transmis par d'autres bactéries (123) laisse cependant penser que des résistances de plus en plus fréquentes pourraient apparaître au fil du temps. Par ailleurs cette capacité à intégrer mais aussi à transmettre de l'information génétique amène à considérer cette espèce non plus seulement comme un agent pathogène potentiellement dangereux mais également comme un vecteur de résistance. En effet, cette bactérie se développe dans le milieu marin, au contact de nombreuses autres espèces. De plus, lorsqu'elle infecte un hôte elle transite dans son tube digestif où réside un très grand nombre de bactéries commensales. Les souches de *V. parahaemolyticus* pourraient donc transmettre des gènes de résistances aux antibiotiques à des bactéries potentiellement plus virulentes ou déjà résistantes à des antibiotiques différents.

L'étape suivante dans l'étude de l'antibiorésistance chez *V. parahaemolyticus* serait de chercher les gènes responsables des résistances observées. Comme expliqué précédemment, plusieurs gènes de résistances aux antibiotiques ont été décrits chez *V. parahaemolyticus* ou chez d'autres espèces du genre *Vibrio*. Parmi ces gènes on peut citer *bla_{VCC-1}* codant pour une carbapénémase chez *V. cholerae* (70), *bla_{CMY-2}* codant pour une céphalosporinase et *bla_{PER-1}* codant pour une BLSE chez *V. parahaemolyticus* (67). La résistance aux tétracyclines étant portée par un très grand nombre de gènes dont la plupart sont retrouvés chez *V. parahaemolyticus*, il semble difficile de tous les chercher. On peut néanmoins dans un premier temps restreindre la recherche aux gènes décrits le plus souvent tels que les gènes *tetB*, *tetC*, *tetD*, *tetG*, et *tetY* (114). Concernant l'azithromycine, l'inhibition de son activité antimicrobienne se fait la plupart du temps via des mécanismes non enzymatiques tels que la

surexpression de la cible (l'ARN ribosomique 23S de la grande sous-unité du ribosome), l'expression d'une pompe à efflux de type ABC ou une mutation de la cible, le plus souvent par une substitution d'une adénine en guanine en position 2058 ou 2059 (A2058G ou A2059G) (115). Cette mutation en particulier est détectable par PCR temps réel, comme réalisé par Chen *et al.* (124) lors d'une étude portant sur la résistance aux macrolides chez *Treponema pallidum*. Les gènes de résistance à la streptomycine *strA* et *strB*, aux sulfamides *sul2* et aux quinolones VPA0095 décrits chez *V. parahaemolyticus* seront aussi intéressants à rechercher pour trouver l'origine des résistances aux antibiotiques et évaluer leur potentielle dissémination.

La souche 16-0006 était porteuse de résistances phénotypiques à la céfoxitine, au céfotaxime, à la ceftazidime, au céfuroxime, au céfépime et aux associations triméthoprime-sulfaméthoxazole et amoxicilline-acide clavulanique. Suite aux travaux présentés dans ce rapport, son génome a été séquencé à l'aide d'un séquenceur NextSeq (Illumina, USA) et les gènes de résistance ont été recherchés via Resfinder. Il a été démontré que cette souche possédait les gènes de résistance *bla_{NDM-1}*, *sul1*, *sul2*, *dfrA16*, *strA*, *strB*, *aadA2*, *floR* et *tetA*. Le gène *bla_{NDM-1}* code pour une carbapénémase conférant une résistance étendue aux bêta-lactamines. Elle a déjà été observée dans des souches d'origine alimentaire telles que *Salmonella enterica* et *Enterobacter spp.* (125,126) mais c'est la première description d'un *Vibrio* d'origine alimentaire porteur de ce gène (69). La localisation du gène sur le génome est pour l'instant inconnue, mais il a pu être transmis à *E. coli* via des tests de conjugaison. Il est à noter que, bien que possédant un gène codant pour une carbapénémase, la souche 16-0006 était phénotypiquement sensible à l'imipénème. Cette observation renforce l'idée que des bactéries peuvent posséder des gènes de résistances non-exprimés et les transmettre à d'autres bactéries qui pourront exprimer une résistance aux carbapénèmes.

Par sa capacité à survivre dans l'environnement, les *Vibrio*, et en particulier *V. parahaemolyticus*, pourraient donc servir de réservoirs de gènes de résistance, y compris les gènes codant les carbapénémases. Les gènes situés sur des intégrons pourraient également favoriser le maintien et la dissémination de la multirésistance.

Valorisation

L'ensemble des analyses réalisées sur cette souche a fait l'objet d'un poster présenté lors du congrès Antimicrobial Resistance in Animals and the Environment (ARAE, Berlin, 26-28 Juin 2018) (Figure 9) et d'une publication dans la revue *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (Impact Factor 2017=5.217) (69).

NDM-1 producing *Vibrio parahaemolyticus* isolated from imported shrimps

A. Briet⁽¹⁾, N. Helsen⁽¹⁾, S. Delannoy⁽²⁾, S. Copin⁽¹⁾, A. Brisabois⁽¹⁾⁽²⁾, G. Midelet-Bourdin⁽¹⁾, S.A Granier⁽²⁾
⁽¹⁾ANSES, Laboratory for food safety, F-63200 Boulogne-sur-mer, France, ⁽²⁾ANSES, Laboratory for food safety, F-94700 Maisons-Alfort, France

Contact details: amaud.briet@anses.fr +33.321.99.25.00 // graziele.bourdin@anses.fr +33.321.99.25.03 // sophie.granier@anses.fr +33.149.77.46.02 // anne.brisabois@anses.fr +33.149.77.28.26







BACKGROUND

- Vibrio parahaemolyticus*:
 - is a foodborne pathogen
 - grows in tropical marine water
 - ocean warming may mediate *Vibrio* expansion in temperate regions and represent an emergent risk to public health
 - may constitute a reservoir of antimicrobial resistance genes
 - can exchange genetic elements with other bacteria such as *Enterobacteriaceae*

GENOTYPIC RESULTS

- BLAST of WGS detected **9 resistance genes** including *bla_{NDM-1}*

Table: resistance genes detected and antibiotic class struck

Gene	Confer resistance to
<i>bla_{NDM-1}</i>	β-lactams
<i>tetA</i>	Tetracyclines
<i>strA</i>	Aminoglycosides
<i>strB</i>	
<i>aadA2</i>	Phenicol
<i>floR</i>	
<i>dfrA16</i>	Folate pathway inhibitors
<i>sul1</i>	
<i>sul2</i>	

PHENOTYPIC RESULTS



Antibiogram of a wild-type strain 15-B3PA-0752

≠



Antibiogram of strain 16-B3PA-006

- Strain 16-B3PA-006 displayed **acquired resistance phenotype** compared to wild-type strain (2)



CIM test results

- CIM test was positive for the strain 16-B3PA-006 : **carbapenemase activity confirmed**

MATERIAL AND METHODS

- Strain 16-B3PA-006 was isolated from shrimp
- Antimicrobial resistance was tested by disk diffusion following the CLSI standards (1)

Antibiotic class tested	
Penicillins (AMP, TEM)	Folate pathway inhibitors (SXT)
β-lactam/β-lactamase inhibitor (AMC)	Tetracyclines (TET)
Cepheims (CEF, FOX, CAZ, CTX)	Macrolides (AZM)
Phenicol (CHL)	Quinolones (NAL, CIP)
Aminoglycosides (STR, GEN)	Lipopeptides (CST)

- Presence of carbapenemase was tested by Carbapenemase Inactivation Method (CIM test) (3)
- Whole Genome Sequencing (WGS) was performed and antibiotic resistance genes were looked for by a BLAST against ResFinder database from the CGE server (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>)

CONCLUSION

- First description of a NDM-1 producing *V. parahaemolyticus* from food
- Multidrug resistant strain 16-B3PA-006 was resistant to several antibiotics classified as critically important by the WHO
- Antibiotic resistance circulation through international food trade should not be underestimated

References

(1) CLSI (2015). CLSI document M02-A12. Wayne, PA: Clinical Laboratory Standards Institute.

(2) CLSI (2015). CLSI document M45. Wayne, PA: Clinical Laboratory Standards Institute.

(3) van der Zwaluw, K., et al. (2015). PLOS ONE 10(3): e0123690.



Figure 9 : Poster présenté au congrès ARAE (Berlin, 26-28 Juin 2018)

J Antimicrob Chemother
doi:10.1093/jac/dky200

NDM-1-producing *Vibrio parahaemolyticus* isolated from imported seafood

Amaud Briet¹, Nicolas Helsens^{1†}, Sabine Delannoy²,
Sabine Debuiche¹, Anne Brisabois^{1,2}, Graziella Midelet¹
and Sophie A. Granier^{1,2*}

¹Anses, Laboratory for food safety, F-62200 Boulogne-sur-Mer, France; ²Université Paris-Est, Anses, Laboratory for food safety, F-94700 Maisons-Alfort, France

*Corresponding author. Tel: +33-6-26-45-32-18;
E-mail: sophie.GRANIER@anses.fr orcid.org/0000-0001-9676-2402

†Present address: SECALIM, INRA, Oniris, Université Bretagne Loire, F-44307 Nantes, France.

Sir,

Vibrio parahaemolyticus is a marine microorganism, frequently isolated from seafood, at water temperatures above 15°C.¹ It is also a foodborne pathogen, often linked to consumption of raw or uncooked seafood, mostly encountered in patients in Asia or the USA.¹ Ingestion of *V. parahaemolyticus*-contaminated seafood can lead to gastroenteritis. Symptoms are abdominal cramps, nausea, diarrhoea, fever, headache and chills.¹ In most cases, *V. parahaemolyticus* infections are self-limiting but, in patients with underlying diseases, *V. parahaemolyticus* can cause septicæmia.¹ To treat severe or prolonged infections, antibiotics such as fluoroquinolones, azithromycin or rifaximin can be prescribed.² WT *V. parahaemolyticus* are characterized as being susceptible to all antibiotic classes, except penicillins.³

V. parahaemolyticus strain 16-B3PA-006 was isolated in January 2016, from a shelled shrimp tail imported from Vietnam to France. Antimicrobial susceptibility was tested by the disc diffusion method (Bio-Rad, Marne-La-Coquette, France), following CLSI recommendations.⁴ Genomic characterization of the isolate was performed by WGS on a NextSeq (Illumina, San Diego, CA, USA). The raw reads were trimmed (minimum length, 35 bp; quality score, 0.03) and assembled in CLC Genomics Workbench 7.5.1, firstly by mapping chromosome 1 and 2 from the *V. parahaemolyticus* reference genome (*V. parahaemolyticus* RIMD 2210633) and then *de novo* assembly of the remaining paired-end reads. A total of 190 contigs were obtained including 60 contigs that did not map the reference genome, indicating the presence of acquired genetic material. The Center for Genomic Epidemiology server (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/>) was used to identify acquired antimicrobial resistance genes (Resfinder), plasmid presence (PlasmidFinder) and ST (MLST).

Strain 16-B3PA-006 was assigned to *V. parahaemolyticus* ST-864. PlasmidFinder identified a unique IncA/C2 plasmid.

V. parahaemolyticus strain 16-B3PA-006 was phenotypically resistant to amoxicillin/clavulanate, cefoxitin, cefotaxime, ceftazidime, cefuroxime, cefepime and trimethoprim/sulfamethoxazole, but remained susceptible to imipenem, tetracycline, ciprofloxacin and gentamicin. Resfinder identified with 100% identity the resistance genes *bla*_{NDM-1}, *sul1*, *sul2*, *dfrA16*, *strA*, *strB* and *aadA2*. Moreover, *flaR* and *tet(A)* were detected with 98.19% and 99.83% identity, respectively. No resistance gene was neighbouring *bla*_{NDM-1}, only *sul1* was on the opposite side of the contig, at a distance of 14 kb. A Blastn analysis of this contig with the National Center for Biotechnology Information nucleotide database identified a part of transposon Tn125: Δ ISAba125, *bla*_{NDM-1}, *ble*, *trpF*, *tat*, *dct*, *groS*, *groL* and IS91. Despite the apparent susceptibility to imipenem, the carbapenem inactivation method result was positive, confirming carbapenemase production by this strain.⁵ Even if the chromosomal or plasmidic location of *bla*_{NDM-1} had not been assessed so far, the carbapenemase phenotype had been successfully transferred to *Escherichia coli* UB5201 strain by conjugation assay.

V. parahaemolyticus 16-B3PA-006 was confirmed to be MDR, by both genotype and phenotype, being resistant to more than three antibiotic classes: β -lactams, folate pathway inhibitors, phenicols, aminoglycosides and tetracyclines. The Tn125 transposon, carried by strain 16-B3PA-006, has been partially described in a clinical case of *Vibrio fluvialis*, but the transposon was not complete.⁶

Since its first description in 2009 in a patient returning from India, NDM-1 has been described in almost all parts of the world and is considered as one of the most clinically significant carbapenemases.⁷ In many of the first cases reported, patients were reporting recent inter-country travel history, not only to the Indian subcontinent, but also to the Balkan states, the Arabian Peninsula and North Africa; some of them having been repatriated for medical purposes.⁷ NDM-1-producing *Vibrio* spp. have been reported to a lesser extent in *V. fluvialis* and *Vibrio cholerae* clinical or environmental samples.^{6,8-10} To our knowledge, this report is the first description of a *V. parahaemolyticus* strain producing NDM-1 isolated from a food item. Other carbapenemase-producing bacteria isolated from foodstuffs have already been reported: NDM-1-producing *Salmonella* and *Enterobacter cloacae* from chicken and clam; and VIM-1-producing *Salmonella* and *E. coli* from pork and Venus clam.¹¹⁻¹⁴ Nicol *et al.*¹² and Roschanski *et al.*¹⁴ highlighted that the sampled food products in their studies were also imported.

Interestingly, strain 16-B3PA-006 was proved to both carry the *bla*_{NDM-1} gene and display *in vitro* carbapenemase activity; nonetheless, the antibiogram categorized it as clinically susceptible to imipenem according to CLSI criteria. *In vitro* susceptibility to any carbapenem had not been described previously in NDM-1-producing *Vibrio* spp.^{6,8-10} Clinical microbiologists should be aware that NDM-1 carbapenemase activity in *V. parahaemolyticus* might be challenging to evidence through routine susceptibility tests.

It is generally assumed that travellers, colonized by carbapenemase-producing bacteria, import it from endemic to non-endemic parts of the world.¹⁵ However, imported food should also

© The Author(s) 2018. Published by Oxford University Press on behalf of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy. All rights reserved.
For permissions, please email: journals.permissions@oup.com.

1 of 2

Research letter

be taken into consideration as a potential vector of dissemination of clinically significant carbapenemases such as NDM-1. The role of the global food trade should certainly not be underestimated anymore as an alternative route for carbapenemase dissemination.

Nucleotide sequence accession number

Strain 16-B3PA-006 sequence is available under GenBank accession number PETB00000000.

Acknowledgements

We would like to thank Stéphanie Copin, Virginie Raguenet, Guylaine Leleu and Régine Quenu for their assistance. We are especially grateful to Didier Mazel for his assistance with the conjugation assay and for providing the recipient strain. We would like to thank the iGenSeq core facility (Brain & Spine Institute, Hôpital Pitié Salpêtrière, Paris, France) for excellent sequencing services.

Funding

This work was supported by a doctoral fellowship from Région Hauts-de-France and by the French national effort to reduce antimicrobial resistance in veterinary medicine called 'EcoAntibio2017' from the Ministry of Agriculture.

Transparency declarations

None to declare.

References

- 1 Su Y-C, Liu C. *Vibrio parahaemolyticus*: a concern of seafood safety. *Food Microbiol* 2007; **24**: 549–58.
- 2 Diemert DJ. Prevention and self-treatment of traveler's diarrhea. *Clin Microbiol Rev* 2006; **19**: 583–94.
- 3 Chiou J, Li R, Chen S. CARB-17 family of β -lactamases mediates intrinsic resistance to penicillins in *Vibrio parahaemolyticus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; **59**: 3593–5.
- 4 Clinical and Laboratory Standards Institute. *Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria—Third Edition: M45*. CLSI, Wayne, PA, USA, 2015.
- 5 van der Zwaluw K, de Haan A, Ruister GN et al. The carbapenem inactivation method (CIM), a simple and low-cost alternative for the Carba NP test to assess phenotypic carbapenemase activity in Gram-negative rods. *PLoS One* 2015; **10**: e0123690.
- 6 Chowdhury G, Pazhani GP, Sarkar A et al. Carbapenem resistance in clonally distinct clinical strains of *Vibrio fluvialis* isolated from diarrheal samples. *Emerg Infect Dis* 2016; **22**: 1754–61.
- 7 Nordmann P, Poirel L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae worldwide. *Clin Microbiol Infect* 2014; **20**: 821–30.
- 8 Darley E, Weeks J, Jones L et al. NDM-1 polymicrobial infections including *Vibrio cholerae*. *Lancet* 2012; **380**: 1358.
- 9 Diep TT, Nguyen NT, Nguyen TN et al. Isolation of New Delhi metallo- β -lactamase 1-producing *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 strain carrying *ctxA*, *st* and *hly* genes in southern Vietnam. *Microbiol Immunol* 2015; **59**: 262–7.
- 10 Walsh TR, Weeks J, Livermore DM et al. Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study. *Lancet Infect Dis* 2011; **11**: 355–62.
- 11 Borowiak M, Szabo I, Baumann B et al. VIM-1-producing *Salmonella* Infantis isolated from swine and minced pork meat in Germany. *J Antimicrob Chemother* 2017; **72**: 2131–3.
- 12 Nicol J, Sarah-Lynn M, Brent PA et al. Carbapenem-resistant *Enterobacter* spp. in retail seafood imported from Southeast Asia to Canada. *Emerg Infect Dis* 2016; **22**: 1675–7.
- 13 Wang W, Baloch Z, Peng Z et al. Genomic characterization of a large plasmid containing a *bla*_{NDM-1} gene carried on *Salmonella enterica* serovar Indiana C629 isolate from China. *BMC Infect Dis* 2017; **17**: 479.
- 14 Roschanski N, Guenther S, Vu TTT et al. VIM-1 carbapenemase-producing *Escherichia coli* isolated from retail seafood, Germany 2016. *Euro Surveill* 2017; **22**: pii=17-00032.
- 15 van der Bij AK, Pitout JDD. The role of international travel in the worldwide spread of multiresistant Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother* 2012; **67**: 2090–100.

Références bibliographiques

1. Delmas G, Jourdan da Silva N, Pihier N, Weill F-X, Vaillant V, De Valk H. Les toxi-infections alimentaires collectives en France entre 2006 et 2008. *Bull Epidémiol Hebd.* 2010;31-2.
2. Janda JM, Powers C, Bryant RG, Abbott SL. Current perspectives on the epidemiology and pathogenesis of clinically significant *Vibrio* spp. *Clinical Microbiology Reviews.* 1988;1(3):245-67.
3. Su YC, Liu C. *Vibrio parahaemolyticus*: A concern of seafood safety. *Food Microbiology.* 2007;24(6):549-58.
4. Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe R V., Widdowson MA, Roy SL, et al. Foodborne illness acquired in the United States-Major pathogens. *Emerging Infectious Diseases.* 2011;17(1):7-15.
5. World Health Organisation. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. World Health Organization; 2014.
6. Barbieri E, Falzano L, Fiorentini C, Pianetti A, Baffone W, Fabbri A, et al. Occurrence, diversity, and pathogenicity of halophilic *Vibrio* spp. and non-O1 *Vibrio cholerae* from estuarine waters along the Italian Adriatic coast. *Applied and Environmental Microbiology.* 1999/05/29. 1999;65(6):2748-53.
7. Theethakaew C, Feil EJ, Castillo-Ramírez S, Aanensen DM, Suthienkul O, Neil DM, et al. Genetic relationships of *Vibrio parahaemolyticus* isolates from clinical, human carrier, and environmental sources in Thailand, determined by multilocus sequence analysis. *Applied and Environmental Microbiology.* 2013/02/05. 2013;79(7):2358-70.
8. Pacini F. Osservazioni microscopiche e deduzione patologiche sul colera asiatico. *Gazette Medicale de Italiana Toscano Firenze.* tip. di F. Bencini; 1854.
9. S. FA, Buchanan RET, Gibbons NE, Bergey. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.* *Taxon.* 1975;24(2/3):377.
10. l'alimentation D générale de. Ordre de méthode - DGAL/SDSSA/2014-487 : Jugement de conformité des lots de produits de la pêche et de coquillages trouvés contaminés par des *Vibrio* suite à des contrôles officiels. 2014;
11. Kaper JB, Morris JG, Levine MM. Cholera. *Clinical Microbiology Reviews.* 1995/01/01. 1995;8(1):48-86.
12. Desmarchelier PM, Senn CR. A molecular epidemiological study of *Vibrio cholerae* in Australia. *Med J Aust.* 1989/06/05. 1989;150(11):631-4.
13. Colwell R, Kaper J, Joseph S. *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and other *Vibrios*: occurrence and distribution in Chesapeake Bay. *Science.* 1977/10/28. 1977;198(4315):394-6.
14. Thompson FL, Iida T, Swings J. Biodiversity of *Vibrios*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 2004;68(3):403-31.
15. Ali M, Nelson AR, Lopez AL, Sack DA. Updated global burden of cholera in endemic countries. *PLoS Neglected Tropical Diseases.* 2015/06/05. 2015;9(6):e0003832.
16. Elhadi N, Radu S, Chen C-H, Nishibuchi M. Prevalence of Potentially Pathogenic *Vibrio* Species in the Seafood Marketed in Malaysia. *Journal of Food Protection.* 2004;67(7):1469-75.
17. Deepanjali a, Kumar HS, Karunasagar I. Seasonal variation in abundance of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* bacteria in oysters along the southwest coast of India. *Applied and environmental microbiology.* 2005;71(7):3575-80.
18. Yano Y, Hamano K, Satomi M, Tsutsui I, Ban M, Aue-umneoy D. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Vibrio* species related to food safety isolated from shrimp

- cultured at inland ponds in Thailand. *Food Control*. 2014;38(1):30–6.
19. Al-Othubi SM, Hanafiah A, Radu S, Neoh H, Jamal R. Rapid detection and E-test antimicrobial susceptibility testing of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from seafood and environmental sources in Malaysia. *Saudi Medical Journal*. 2011;32(4):400–6.
 20. Oramadike C, Ogunbanwo ST. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from seafoods in Lagos Lagoon Nigeria. *Cogent Food & Agriculture*. 2015;1(1):1041349.
 21. McLaughlin JB, DePaola A, Bopp CA, Martinek KA, Napolilli NP, Allison CG, et al. Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* Gastroenteritis Associated with Alaskan Oysters. *New England Journal of Medicine*. 2005;353(14):1463–70.
 22. Wagley S, Koofhethile K, Rangdale R. Prevalence and Potential Pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* in Chinese Mitten Crabs (*Eriocheir sinensis*) Harvested from the River Thames Estuary, England. *Journal of Food Protection*. 2009;72(1):60–6.
 23. Rodriguez-Castro A, Ansedo-Bermejo J, Blanco-Abad V, Varela-Pet J, Garcia-Martin O, Martinez-Urtaza J. Prevalence and genetic diversity of pathogenic populations of *Vibrio parahaemolyticus* in coastal waters of Galicia, Spain. *Environmental Microbiology Reports*. 2010;2(1):58–66.
 24. Anses. Avis et rapport de l'Anses relatifs à une demande d'évaluation du risque lié à *Vibrio parahaemolyticus* via la consommation de produits de la mer. 2012;
 25. Ceccarelli D, Hasan NA, Huq A, Colwell RR. Distribution and dynamics of epidemic and pandemic *Vibrio parahaemolyticus* virulence factors. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2013;3(97):10.3389.
 26. Alam M, Tomochika K, Miyoshi S, Shinoda S. Environmental investigation of potentially pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in the Seto-inland Sea, Japan. *FEMS Microbiol Lett*. 2002;208(1):83–87.
 27. Robert-Pillot A, Guénolé A, Lesne J, Delesmont R, Fournier JM, Quilici ML. Occurrence of the *tdh* and *trh* genes in *Vibrio parahaemolyticus* isolates from waters and raw shellfish collected in two French coastal areas and from seafood imported into France. *International Journal of Food Microbiology*. 2004;91(3):319–25.
 28. O'Neill KR, Jones SH, Grimes DJ. Seasonal incidence of *Vibrio vulnificus* in the Great Bay estuary of New Hampshire and Maine. *Applied and Environmental Microbiology*. 1992/10/01. 1992;58(10):3257–62.
 29. DePaola A, Capers GM, Alexander D. Densities of *Vibrio vulnificus* in the intestines of fish from the U.S. Gulf coast. *Applied and Environmental Microbiology*. 1994;60(3):984–8.
 30. Do Nascimento SMM, Vieira RHSDF, Theophilo GND, Rodrigues DDP, Vieira GHF. *Vibrio vulnificus* as a health hazard for shrimp consumers. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 2001;43(5):263–6.
 31. Oliver JD. The Biology of *Vibrio vulnificus*. *Microbiology Spectrum*. 2015/07/18. 2015;3(3).
 32. Motes ML, DePaola A, Cook DW, Veazey JE, Hunsucker JC, Garthright WE, et al. Influence of water temperature and salinity on *Vibrio vulnificus* in Northern Gulf and Atlantic Coast oysters (*Crassostrea virginica*). *Applied and Environmental Microbiology*. 1998/04/18. 1998;64(4):1459–65.
 33. Cruz CD, Chycka M, Hedderley D, Fletcher GC. Prevalence, characteristics and ecology of *Vibrio vulnificus* found in New Zealand shellfish. *Journal of Applied Microbiology*. 2016/01/21. 2016;120(4):1100–7.
 34. Tao Z, Larsen AM, Bullard SA, Wright AC, Arias CR. Prevalence and population structure of *Vibrio vulnificus* on fishes from the northern Gulf of Mexico. *Applied and*

- Environmental Microbiology. 2012/08/28. 2012;78(21):7611–8.
35. Jones MK, Oliver JD. *Vibrio vulnificus*: Disease and pathogenesis. Infection and Immunity. 2009/03/04. 2009;77(5):1723–33.
 36. Ralston EP, Kite-Powell H, Beet A. An estimate of the cost of acute health effects from food- and water-borne marine pathogens and toxins in the USA. Journal of Water and Health. 2011/11/04. 2011;9(4):680–94.
 37. Merkel S, Alexander S, Zufall E. Essential Role for Estrogen in Protection against *Vibrio vulnificus*-Induced Endotoxic Shock. Infection and Immunity. 2001;69(10):6119–22.
 38. Taylor RK, Miller VL, Furlong DB, Mekalanos JJ. Use of *phoA* gene fusions to identify a pilus colonization factor coordinately regulated with cholera toxin. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1987;84(9):2833–7.
 39. Reidl J, Klose KE. *Vibrio cholerae* and cholera: Out of the water and into the host. FEMS Microbiology Reviews. 2002;26(2):125–39.
 40. Miyamoto Y, Kato T, Obara Y, Akiyama S, Takizawa K, Yamai S. In vitro hemolytic characteristic of *Vibrio parahaemolyticus*: its close correlation with human pathogenicity. Journal of Bacteriology. 1969/11/01. 1969;100(2):1147–9.
 41. Sakazaki R, Iwanami S, Tamura K. Studies on the enteropathogenic, facultatively halophilic bacterium, *Vibrio parahaemolyticus*. II. Serological characteristics. Japanese journal of medical science & biology. 1968;21(5):313.
 42. Honda T, Ni Y, Miwatani T, Adachi T, Kim J. The thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* is a pore-forming toxin. Canadian Journal of Microbiology. 1992 Nov;38(11):1175–80.
 43. Huntley JS, Hall AC. Aspects of the Hemolytic Reaction Induced By Kanagawa Hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*. Toxicon. 1994/11/01. 1994;32(11):1397–412.
 44. Takahashi A, Sato Y, Shiomi Y, Cantarelli V V., Iida T, Lee M, et al. Mechanisms of chloride secretion induced by thermostable direct haemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* in human colonic tissue and a human intestinal epithelial cell line. Journal of Medical Microbiology. 2000/08/31. 2000;49(9):801–10.
 45. Park K-S, Ono T, Rokuda M, Jang M-H, Okada K, Iida T, et al. Functional characterization of two type III secretion systems of *Vibrio parahaemolyticus*. Infection and immunity. 2004/10/27. 2004;72(11):6659.
 46. Shimohata T, Takahashi A. Diarrhea induced by infection of *Vibrio parahaemolyticus*. The Journal of Medical Investigation. 2010/09/18. 2010;57(3,4):179–82.
 47. Ono T, Park KS, Ueta M, Iida T, Honda T. Identification of proteins secreted via *Vibrio parahaemolyticus* type III secretion system 1. Infection and Immunity. 2006/01/24. 2006;74(2):1032–42.
 48. Matsumoto C, Okuda J, Ishibashi M, Iwanaga M, Garg P, Rammamurthy T, et al. Pandemic spread of an O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* and emergence of related strains evidenced by arbitrarily primed PCR and toxRS sequence analyses. Journal of Clinical Microbiology. 2000/02/03. 2000;38(2):578–85.
 49. Rosche TM, Yano Y, Oliver JD. A rapid and simple PCR analysis indicates there are two subgroups of *Vibrio vulnificus* which correlate with clinical or environmental isolation. Microbiology and Immunology. 2005;49(4):381–9.
 50. Zaidenstein R, Sadik C, Lerner L, Valinsky L, Kopelowitz J, Yishai R, et al. Clinical characteristics and molecular subtyping of *Vibrio vulnificus* illnesses, Israel. Emerging infectious diseases. 2008/12/03. 2008;14(12):1875–82.
 51. Warner E, Oliver JD. Population structures of two genotypes of *Vibrio vulnificus* in oysters (*Crassostrea virginica*) and seawater. Applied and Environmental Microbiology. 2007/11/13. 2008;74(1):80–5.

52. Bross MH, Soch K, Morales R, Mitchell RB. *Vibrio vulnificus* infection: Diagnosis and treatment. *American Family Physician*. 2007/09/15. 2007;76(4):539–44.
53. Bogard RW, Oliver JD. Role of iron in human serum resistance of the clinical and environmental *Vibrio vulnificus* genotypes. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007/10/16. 2007;73(23):7501–5.
54. Wright AC, Simpson LM, Oliver JD. Role of iron in the pathogenesis of *Vibrio vulnificus* infections. *Infection and Immunity*. 1981/11/01. 1981;34(2):503–7.
55. Yoshida SI, Ogawa M, Mizuguchi Y. Relation of capsular materials and colony opacity to virulence of *Vibrio vulnificus*. *Infection and Immunity*. 1985/02/01. 1985;47(2):446–51.
56. McPherson VL, Watts JA, Simpson LM, Oliver JD. Physiological effects of the lipopolysaccharide of *Vibrio vulnificus* on mice and rats. *Microbios*. 1991/01/01. 1991;67(272–273):141–9.
57. Lee JH, Kim MW, Kim BS, Kim SM, Lee BC, Kim TS, et al. Identification and characterization of the *Vibrio vulnificus* rtxA essential for cytotoxicity in vitro and virulence in mice. *Journal of microbiology (Seoul, Korea)*. 2007/05/08. 2007;45(2):146–52.
58. Lee BC, Choi SH, Kim TS. *Vibrio vulnificus* RTX toxin plays an important role in the apoptotic death of human intestinal epithelial cells exposed to *Vibrio vulnificus*. *Microbes and Infection*. 2008/10/14. 2008;10(14–15):1504–13.
59. Kim YB, Okuda J, Matsumoto C, Takahashi N, Hashimoto S, Nishibuchi M. Identification of *Vibrio parahaemolyticus* strains at the species level by PCR targeted to the toxR gene. *Journal of Clinical Microbiology*. 1999;37(4):1173–7.
60. Lin Z, Kumagai K, Baba K, Mekalanos JJ, Nishibuchi M. *Vibrio parahaemolyticus* has a homolog of the *Vibrio cholerae* toxRS operon that mediates environmentally induced regulation of the thermostable direct hemolysin gene. *Journal of Bacteriology*. 1993;175(12):3844–55.
61. Croci L, Suffredini E, Cozzi L, Toti L, Ottaviani D, Pruzzo C, et al. Comparison of different biochemical and molecular methods for the identification of *Vibrio parahaemolyticus*. *JApplMicrobiol*. 2007;102(1):229–37.
62. Lee CY, Pan SF, Chen CH, Lee C, Pan S, Chen C. Sequence of a cloned pR72H fragment and its use for detection of *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish with the PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. 1995;61(4):1311–7.
63. Robert-Pillot A, Copin S, Gay M, Malle P, Quilici ML. Total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in shrimp: Fast and reliable quantification by real-time PCR. *International Journal of Food Microbiology*. 2010/09/17. 2010;143(3):190–7.
64. Robert-Pillot A, Guenole A, Fournier JM. Usefulness of R72H PCR assay for differentiation between *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* species: Validation by DNA-DNA hybridization. *FEMS Microbiology Letters*. 2002;215(1):1–6.
65. Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*. 1991 Jan 1;173(2):697–703.
66. Jiang Y, Yao L, Li F, Tan Z, Zhai Y, Wang L. Characterization of antimicrobial resistance of *Vibrio parahaemolyticus* from cultured sea cucumbers (*Apostichopus japonicas*). *Letters in Applied Microbiology*. 2014;59(2):147–54.
67. Li R, Lin D, Chen K, Wong MHY, Chen S. First detection of AmpC β -lactamase blaCMY-2 on a conjugative IncA/C plasmid in a *Vibrio parahaemolyticus* isolate of food origin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2015;59(7):4106–11.
68. Mandal J, Sangeetha V, Ganesan V, Parveen M, Preethi V, Harish BN, et al. Third-generation cephalosporin-resistant *Vibrio cholerae*, India. *Emerging Infectious Diseases*.

- 2012;18(8):1326–8.
69. Briet A, Helsen N, Delannoy S, Debuiche S, Brisabois A, Midelet G, et al. NDM-1-producing *Vibrio parahaemolyticus* isolated from imported seafood. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2018/05/26. 2018;(May):2–3.
 70. Mangat CS, Boyd D, Janecko N, Martz SL, Desruisseau A, Carpenter M, et al. Characterization of VCC-1, a novel ambler class a carbapenemase from *Vibrio cholerae* isolated from imported retail shrimp sold in Canada. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2016;60(3):1819–25.
 71. Baron S, Larvor E, Chevalier S, Jouy E, Kempf I, Granier SA, et al. Antimicrobial susceptibility among urban wastewater and wild shellfish isolates of Non-O1/Non-O139 *Vibrio cholerae* from La Rance estuary (Brittany, France). *Frontiers in Microbiology*. 2017 Sep 12;8(SEP):1637.
 72. Caprioli Busani, L., Martel, J.L., Helmuth, R. A. Monitoring of antibiotic resistance in bacteria of animal origin: epidemiological and microbiological methodologies. *International Journal of Antimicrobial Agents* 14, 295–304. 2000;14(4):295–301.
 73. CASFM / EUCAST : Société Française de Microbiologie Ed ; 2018. 2018;
 74. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). *Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria*. 3rd ed. CLSI guideline M45 Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2016;
 75. Bath L, Cody D, Krogvold L, Sundberg F, Bangstad HJ. Annual conference 2013 highlights. *Pediatric diabetes*. 1966/04/01. 2014;15(3):257–9.
 76. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). *Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria*, 2nd ed. CLSI guideline M45-A2 Wayne, PA Clinical and Laboratory Standards Institute; 2010. 2015;
 77. Fosse T, Giraud-Morin C, Madinier I. Induced colistin resistance as an identifying marker for *Aeromonas* phenospecies groups. *Letters in Applied Microbiology*. 2003;36(1):25–9.
 78. Sahilah AM, Laila RAS, Sallehuddin HM, Osman H, Aminah A, Ahmad Azuhairi A. Antibiotic resistance and molecular typing among cockle (*Anadara granosa*) strains of *Vibrio parahaemolyticus* by polymerase chain reaction (PCR)-based analysis. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2014;30(2):649–59.
 79. Elexson N, Afsah-Hejri L, Rukayadi Y, Soopna P, Lee HY, Tuan Zainazor TC, et al. Effect of detergents as antibacterial agents on biofilm of antibiotics-resistant *Vibrio parahaemolyticus* isolates. *Food Control*. 2014;35(1):378–85.
 80. Ahmed HA, El Bayomi RM, Hussein MA, Khedr MHE, Abo Remela EM, El-Ashram AMM. Molecular characterization, antibiotic resistance pattern and biofilm formation of *Vibrio parahaemolyticus* and *V. cholerae* isolated from crustaceans and humans. *International Journal of Food Microbiology*. 2018;274:31–7.
 81. Feglo PK, Sewurah M. Characterization of highly virulent multidrug resistant *Vibrio cholerae* isolated from a large cholera outbreak in Ghana. *BMC Research Notes*. 2018 Dec 18;11(1):45.
 82. Maharjan S, Rayamajhee B, Shreshtha A, Acharya J. Serotyping and antibiotic susceptibility patterns of *Vibrio* and *Shigella* isolates from diarrheal patients visiting a Tropical and Infectious Diseases Hospital in central Nepal. *BMC Research Notes*. 2017 Dec 28;10(1):626.
 83. Tjaniadi P, Lesmana M, Subekti D, Machpud N, Komalarini S, Santoso W, et al. Antimicrobial resistance of bacterial pathogens associated with diarrheal patients in Indonesia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2003/07/31.

- 2003;68(6):666–70.
84. Chandrasekhar MR, Krishna BVS, Patil AB. Changing characteristics of *Vibrio cholerae*: Emergence of multidrug resistance and non-O1, non-O139 serogroups. Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health. 2008/12/10. 2008;39(6):1092–7.
 85. Krishna BVS, Patil AB, Chandrasekhar MR. Fluoroquinolone-resistant *Vibrio cholerae* isolated during a cholera outbreak in India. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 2005/10/26. 2006;100(3):224–6.
 86. Ottaviani D, Medici L, Talevi G, Napoleoni M, Serratore P, Zavatta E, et al. Molecular characterization and drug susceptibility of non-O1/O139 *V. cholerae* strains of seafood, environmental and clinical origin, Italy. Food Microbiology. 2018;72:82–8.
 87. Mekalanos JJ, Rubin EJ, Waldor MK. Cholera: Molecular basis for emergence and pathogenesis. FEMS Immunology and Medical Microbiology. 1997/08/01. 1997;18(4):241–8.
 88. Sedas VTP. Influence of environmental factors on the presence of *Vibrio cholerae* in the marine environment: a climate link. Journal of infection in developing countries. 2007/01/01. 2007;1(3):224–41.
 89. Staley C, Harwood VJ. The use of genetic typing methods to discriminate among strains of *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, and *v. vulnificus*. Journal of AOAC International. 2010 Dec;93(5):1553–69.
 90. Ji H, Chen Y, Guo Y, Liu X, Wen J, Liu H. Occurrence and characteristics of *Vibrio vulnificus* in retail marine shrimp in China. Food Control. 2011;22(12):1935–40.
 91. Baker-Austin C, McArthur J V., Lindell AH, Wright MS, Tuckfield RC, Gooch J, et al. Multi-site analysis reveals widespread antibiotic resistance in the marine pathogen *Vibrio vulnificus*. Microbial Ecology. 2008/07/22. 2009;57(1):151–9.
 92. Centers for Disease Control and Prevention. The pre-travel consultation, Chapter 2 : Traveler’s Diarrhea. Traveler’s health-yellow book. 2016;
 93. Klontz KC, Lieb S, Schreiber M, Janowski HT, Baldy LM, Gunn RA. Syndromes of *Vibrio vulnificus* infections. Clinical and epidemiologic features in Florida cases, 1981-1987. Annals of Internal Medicine. 1988/08/15. 1988;109(4):318–23.
 94. *Vibrio vulnificus*. Centers for Disease Control and Prevention. Atlanta: Available online at: <http://www.cdc.gov/Vibrio/Vibriov.html>. 2013;
 95. Kaneko T, Colwell RR. Incidence of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay. Applied microbiology. 1975;30(2):251–7.
 96. Hombach M, Courvalin P, Böttger EC. Validation of antibiotic susceptibility testing guidelines in a routine clinical microbiology laboratory exemplifies general key challenges in setting clinical breakpoints. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2014/04/30. 2014;58(7):3921–6.
 97. Kronvall G. Determination of the real standard distribution of susceptible strains in zone histograms. International Journal of Antimicrobial Agents. 2003;22(1):7–13.
 98. Kronvall G, Kahlmeter G, Myhre E, Galas MF. A new method for normalized interpretation of antimicrobial resistance from disk test results for comparative purposes. Clinical Microbiology and Infection. 2003;9(2):120–32.
 99. Di Pinto A, Terio V, Novello L, Tantillo G. Comparison between thiosulphate-citrate-bile salt sucrose (TCBS) agar and CHROMagar *Vibrio* for isolating *Vibrio parahaemolyticus*. Food Control. 2011;22(1):124–7.
 100. Fabbro C, Cataletto B, Del Negro P. Detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* through biochemical and molecular-based methodologies in coastal waters of the Gulf of Trieste (North Adriatic Sea). FEMS Microbiology Letters. 2010 Mar 30;307(2):158–

- 64.
101. Ghenem L, Elhadi N. Isolation, molecular characterization, and antibiotic resistance patterns of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from coastal water in the Eastern Province of Saudi Arabia. *Journal of water and health*. 2018;16(March):0–13.
 102. Tarr CL, Patel JS, Puhr ND, Sowers EG, Bopp CA, Strockbine NA. Identification of *Vibrio* isolates by a multiplex PCR assay and *rpoB* sequence determination. *Journal of Clinical Microbiology*. 2006/11/10. 2007;45(1):134–40.
 103. Hicks LA, Taylor TH, Hunkler RJ. U.S. Outpatient Antibiotic Prescribing, 2010. *New England Journal of Medicine*. 2013;368(15):1461–2.
 104. Han F, Walker RD, Janes ME, Prinyawiwatkul W, Ge B. Antimicrobial susceptibilities of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* isolates from Louisiana Gulf and retail raw oysters. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007;73(21):7096–8.
 105. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria. CLSI guideline M45-A2 Wayne, PA Clinical and Laboratory Standards Institute; 2010. 2006;
 106. Blake PA, Merson MH, Weaver RE, Hollis DG, Heublein PC. Disease Caused by a Marine *Vibrio*. *New England Journal of Medicine*. 1979/01/04. 1979;300(1):1–5.
 107. Fri J, Ndip RN, Njom HA, Clarke AM. Antibiotic Susceptibility of Non-Cholera *Vibrios* Isolated from Farmed and Wild Marine Fish (*Argyrosomus japonicus*), Implications for Public Health. *Microbial Drug Resistance*. 2018/03/23. 2018;0(0):mdr.2017.0276.
 108. Livermore DM, Mushtaq S, Warner M, Zhang J, Maharjan S, Doumith M, et al. Activities of NXL104 combinations with ceftazidime and aztreonam against carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2010/11/03. 2011;55(1):390–4.
 109. Call DR, Singer RS, Meng D, Broschat SL, Orfe LH, Anderson JM, et al. *bla*_{CMY-2}-positive IncA/C plasmids from *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* are a distinct component of a larger lineage of plasmids. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2009/12/02. 2010;54(2):590–6.
 110. Bedenić B, Vranić-Ladavac M, Venditti C, Tambić-Andrašević A, Barišić N, Gužvinec M, et al. Emergence of colistin resistance in *Enterobacter aerogenes* from Croatia. *Journal of Chemotherapy*. 2017/10/25. 2018;30(2):120–3.
 111. Bier N, Schwartz K, Guerra B, Strauch E. Survey on antimicrobial resistance patterns in *Vibrio vulnificus* and *Vibrio cholerae* non-O1/non-O139 in Germany reveals carbapenemase-producing *Vibrio cholerae* in coastal waters. *Frontiers in Microbiology*. 2015/11/19. 2015;6(OCT):1179.
 112. Letchumanan V, Yin WF, Lee LH, Chan KG. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from retail shrimps in Malaysia. *Frontiers in Microbiology*. 2015;6(JAN):33.
 113. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria, 2nd ed. CLSI guideline M45-A2 Wayne, PA Clinical and Laboratory Standards Institute; 2010. 2010;30(August).
 114. Furushita M, Shiba T, Maeda T, Yahata M, Kaneoka A, Takahashi Y, et al. Similarity of Tetracycline Resistance Genes Isolated from Fish Farm Bacteria to Those from Clinical Isolates Similarity of Tetracycline Resistance Genes Isolated from Fish Farm Bacteria to Those from Clinical Isolates. *Applied and Environmental Microbiology*. 2003;69(9):5336–42.
 115. Bhattacharya D, Sayi DS, Thamizhmani R, Bhattacharjee H, Bharadwaj AP, Roy A, et al. Short report: Emergence of multidrug-resistant *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor in

- Port Blair, India. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 2012/06/06. 2012;86(6):1015–7.
116. Xiong W, Sun Y, Zhang T, Ding X, Li Y, Wang M, et al. Antibiotics, Antibiotic Resistance Genes, and Bacterial Community Composition in Fresh Water Aquaculture Environment in China. *Microbial Ecology*. 2015/03/11. 2015;70(2):425–32.
 117. Shaw KS, Rosenberg Goldstein RE, He X, Jacobs JM, Crump BC, Sapkota AR. Antimicrobial susceptibility of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* recovered from recreational and commercial areas of Chesapeake Bay and Maryland Coastal Bays. *PLoS ONE*. 2014;9(2):e89616.
 118. Sudha S, Mridula C, Silvester R, Hatha AAM. Prevalence and antibiotic resistance of pathogenic *Vibrios* in shellfishes from Cochin market. 2014;43(MAY 2014):815–24.
 119. Saga T, Kaku M, Onodera Y, Yamachika S, Sato K, Takase H. *Vibrio parahaemolyticus* chromosomal *qnr* homologue VPA0095: Demonstration by transformation with a mutated gene of its potential to reduce quinolone susceptibility in *Escherichia coli* [3]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2005/04/28. 2005;49(5):2144–5.
 120. Li R, Ye L, Zheng Z, Chan EWC, Chen S. Genetic Characterization of a *bla_{VEB-2}*-carrying plasmid in *Vibrio parahaemolyticus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2016 Sep 19;
 121. Liu M, Wong MHY, Chen S. Molecular characterisation of a multidrug resistance conjugative plasmid from *Vibrio parahaemolyticus*. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2013 Dec 1;42(6):575–9.
 122. Vora GJ, Meador CE, Bird MM, Bopp CA, Andreadis JD, Stenger DA. Microarray-based detection of genetic heterogeneity, antimicrobial resistance, and the viable but nonculturable state in human pathogenic *Vibrio* spp. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005 Dec 27;102(52):19109 LP-19114.
 123. Stewart GJ, Sinigalliano CD. Detection of horizontal gene transfer by natural transformation in native and introduced species of bacteria in marine and synthetic sediments. *Applied and Environmental Microbiology*. 1990/06/01. 1990;56(6):1818–24.
 124. Chen XS, Yin YP, Wei WH, Wang HC, Peng RR, Zheng HP, et al. High prevalence of azithromycin resistance to *Treponema pallidum* in geographically different areas in China. *Clinical Microbiology and Infection*. 2012/12/13. 2013;19(10):975–9.
 125. Wang W, Baloch Z, Peng Z, Hu Y, Xu J, Fanning S, et al. Genomic characterization of a large plasmid containing a *bla_{NDM-1}* gene carried on *Salmonella enterica* serovar Indiana C629 isolate from China. *BMC Infectious Diseases*. 2017/07/09. 2017;17(1):479.
 126. Janecko N, Martz SL, Avery BP, Daignault D, Desruisseau A, Boyd D, et al. Carbapenem-resistant *Enterobacter* spp. In retail seafood imported from southeast asia to Canada. *Emerging Infectious Diseases*. 2016/08/18. 2016;22(9):1675–7.

<https://microbiologyinfo.com>

<http://www.chromagar.com>

www.blast.ncbi.nlm.nih.gov

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>

<https://www.anses.fr/fr/content/les-toxi-infections-alimentaires-collectives-tiac>

<http://www.who.int>

NOM et Prénom : HELSENS Nicolas.....

TITRE DE LA THESE

Etude de la résistance aux antibiotiques de souches de *Vibrio parahaemolyticus* isolées de produits de la pêche

Rennes, le 12/07/2018

Le Président de thèse : Pr Anne Gougeon



Le Directeur de thèse : Pr Anne Gougeon



VU et Permis d'imprimer

Le Président de l'Université de Rennes1.


D.ALIS

HELSENS, Nicolas - Etude de la résistance aux antibiotiques de souches de *Vibrio parahaemolyticus* isolées de produits de la pêche

51 feuilles, 8 illustrations, 4 tableaux, Thèse : Pharmacie ; Rennes 1; 2018 ; N° .

Résumé français : La résistance aux antibiotiques chez les bactéries pathogènes est un enjeu de santé publique. Le milieu marin est peu étudié mais c'est un réservoir potentiel de bactéries et de gènes de résistance. *Vibrio parahaemolyticus* est une bactérie pathogène naturellement présente dans le milieu marin, et pouvant échanger des gènes avec les bactéries environnantes. L'objectif de ces travaux était d'étudier la résistance aux antibiotiques de souches de *Vibrio parahaemolyticus* isolées de produits de la pêche. Le panel de souches étudiées comprenait 225 souches isolées au laboratoire et 23 souches identifiées pendant l'étude par des tests biochimiques et de biologie moléculaire. Des antibiogrammes ont été réalisés sur ce panel de souches. Sur les 248 souches étudiées, 39 possédaient 1 à 8 profils atypiques, dont une souche multi-résistante. Il semble donc que les souches de *V. parahaemolyticus* issues des produits de la pêche soient majoritairement sensibles aux antibiotiques mais que des résistances apparaissent.

Résumé anglais : Antimicrobial resistance of pathogenic bacteria is a public health issue. Although being little studied, the marine environment contains many bacteria and antimicrobial resistance genes. Studying *Vibrio parahaemolyticus* is pathogenic and naturally present in the marine environment. It can also exchange genes with surrounding bacteria. The aim of this work was to study antimicrobial resistance of *V. parahaemolyticus* strains isolated from seafood. The pool of strains contained 225 strains isolated in the laboratory and 23 strains identified during the study through biochemical and molecular biology tests. Antibiograms were realised on these strains. Out of 248 tested strains, 39 showed 1 to 8 atypical profiles, of which one was multiresistant. It seems that strains of *V. parahaemolyticus* isolated from sea products are mainly sensitive to antibiotics, but antimicrobial resistance emerges.

Rubrique de classement : Microbiologie

Mots-clés : *Vibrio parahaemolyticus* ; antibiotiques ; résistance ; antibiogrammes ; produits de la mer

Mots-clés anglais MeSH : *Vibrio parahaemolyticus* ; antibiotic ; antimicrobial resistance ; antibiograms ; seafood

Président : Madame Anne GOUEON-JOLIVET

JURY :
Assesseurs : Mme Anne GOUGEON-JOLIVET [directeur de thèse]
M Pierre-Yves DONNION
Mme Sandrine BARON