

# Maitrise du risque lié à *Vibrio parahaemolyticus* dans les produits halieutiques destinés à l'exportation : cas d'une usine sénégalaise de pêche

Ignace Coly <sup>(1)</sup>, Amy Gassama Sow <sup>(2)</sup>, Malang Seydi <sup>(3)</sup>, Jaime Martinez-Urtaza <sup>(4)</sup>

<sup>(1)</sup> Amerger Groupe Vieirasa. Laboratoire d'Analyse et de Contrôle Qualité. Presqu'île Hersent - Bel Air. BP 3348. Dakar (Sénégal). E-mail : ignacol@gmail.com

<sup>(2)</sup> Institut Pasteur. Laboratoire de Bactériologie Expérimentale. 36, Avenue Pasteur. B.P 220. Dakar (Sénégal).

<sup>(3)</sup> École Inter-États des Sciences et Médecine Vétérinaire (EISMV). Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale (HIDAOA). Km 9, Boulevard du Centenaire. BP 5077. Dakar (Sénégal).

<sup>(4)</sup> University of Bath. Claverton Down. Bath BA2 7AY (United Kingdom).

Reçu le 22 juillet 2014, accepté le 11 mai 2015.

**Description du sujet.** L'article traite de la mise en œuvre de procédures assainissantes fondées sur le HACCP dans une entreprise sénégalaise spécialisée dans l'exportation de produits halieutiques.

**Objectifs.** L'objectif de l'étude est la maitrise du risque *Vibrio parahaemolyticus* dans les produits halieutiques sénégalais exportés en Europe.

**Méthode.** L'étude a porté sur 101 échantillons de produits finis qui ont été analysés par la méthode ISO 8914, 1990 pour apprécier la présence de souches pathogènes de *V. parahaemolyticus*. Le procédé de fabrication initial a ensuite été modifié en renforçant les bonnes pratiques d'hygiène et les traitements assainissants au chlore. Le nouveau procédé a été testé avec 26 échantillons pour apprécier son efficacité. Les 26 échantillons ont été analysés en utilisant la même méthode ISO 8914:1990.

**Résultats.** Sur les 101 échantillons provenant du premier procédé de fabrication, des souches de *V. parahaemolyticus* ont été isolées à un taux de 6,9 %. Elles étaient toutes porteuses des gènes *tlh*, mais dépourvues des gènes de virulence *tdh* et *trh*. Toutefois, aucune souche de *Vibrio cholerae* ou de *Vibrio vulnificus* n'ont été détectées. Le nouveau procédé a significativement réduit le taux de présence de *V. parahaemolyticus* sur le produit fini puisqu'un contrôle effectué sur 26 échantillons a démontré l'absence de *Vibrio* spp. dès l'étape de l'isolement bactériologique.

**Conclusions.** La mise en œuvre rigoureuse des Bonnes Pratiques d'Hygiène et de Fabrication et le renforcement des traitements assainissants au chlore ont permis de réduire significativement le taux de *Vibrio* spp. sur les produits finis.

**Mots-clés.** *Vibrio*, contamination biologique, infestation, produit de la pêche, chlore, Sénégal.

## Control of *Vibrio parahaemolyticus* risk in exported seafood products: Case of a Senegalese fishing factory

**Description of the subject.** The article deals with the implementation of sanitizing procedures based on HACCP in a Senegalese company specialized in exporting seafood products.

**Objectives.** The objective of the study was to improve the risk control of *Vibrio parahaemolyticus* in Senegalese seafood products exported to Europe.

**Method.** The study focused on 101 samples of finished products, which were analyzed using the ISO 8914:1990 method, to assess the presence of pathogenic *V. parahaemolyticus*. The initial manufacturing process was then modified by increasing good hygiene practices and sanitizing chlorine treatments. The new process was tested with 26 samples to assess its effectiveness. The 26 samples were analyzed using the same method, ISO 8914:1990.

**Results.** Of the 101 samples obtained from the first manufacturing method, *V. parahaemolyticus* strains were isolated at a rate of 6.9%. All of these were found to possess the *tlh*, but not the *tdh* or *trh* genes. However, no strains of *Vibrio cholerae* or *Vibrio vulnificus* were detected. The new process significantly reduced the rate of *V. parahaemolyticus* detected in the finished products, as evidenced by the 26 checks on product samples, which showed the absence of *Vibrio* spp. strains from the bacteriologic isolation stage.

**Conclusions.** The rigorous implementation of good hygiene and manufacturing practices and the reinforcement of sanitizing chlorine treatments significantly reduced the rate of *V. parahaemolyticus* in the finished products.

**Keywords.** *Vibrio*, biological contamination, fishery products, infestation, chlorine, Senegal.

## 1. INTRODUCTION

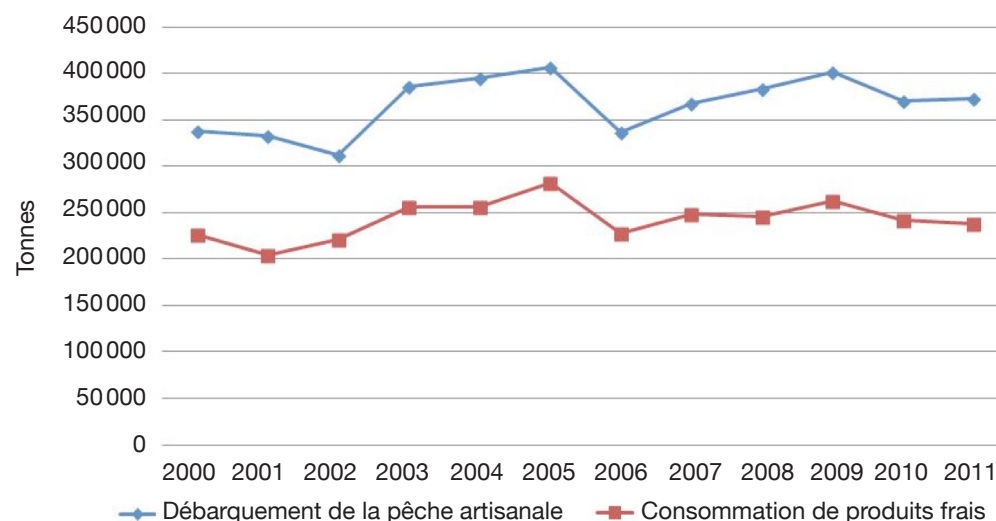
Avec une façade maritime d'environ 718 km, le Sénégal est la partie de l'Afrique de l'Ouest la plus avancée dans l'océan Atlantique. Cette région maritime occidentale, réputée très poissonneuse (PNUE, 2004 ; FAO/COPACE/COREP, 2010) confère au pays une position stratégique dans le cadre de l'exploitation et du commerce international des produits de la mer (**Figure 1**). Avec 301 milliards de francs CFA (environ 460 millions d'euros) de chiffre d'affaires en 2011, la pêche maritime contribue au PIB national et aux recettes d'exportation respectivement pour 1,3 % et 12,3 % (ANSD, 2013). Aujourd'hui, le secteur emploie environ 17 % de la main-d'œuvre nationale.

De 1970 à nos jours, le volume des débarquements a été multiplié quasiment par 10 passant de 50 000 t à plus de 450 000 t (ANSD, 2007 ; 2008 ; 2009 ; 2010 ; 2011 ; 2013). En effet, la pêche occupe une place de choix dans l'économie et la société sénégalaises du fait de sa contribution à l'équilibre de la balance des paiements, à la baisse du chômage et à la couverture des besoins en protéines de la population sénégalaise (ANSD, 2007 ; 2008 ; 2009 ; 2010 ; 2011 ; 2013).

En aout 2013, 136 unités agréées pour pratiquer le mareyage à l'exportation ont été recensées au Sénégal. Toutefois, l'Union européenne subordonne l'importation à partir d'un pays tiers de produits de la pêche dans le marché de l'Union, à la mise en place d'un programme de gestion de la qualité basé sur le système « *Hazard Analysis Critical Control Point* » (HACCP). Malgré les efforts consentis et les progrès réalisés dans

ce domaine par la plupart des structures exportatrices au Sénégal, les rapports des missions de l'Office Alimentaire et Vétérinaire montrent que le Sénégal devrait offrir des garanties suffisantes concernant les conditions sanitaires des produits de la pêche destinés à être importés dans l'UE (DG[SANCO], 2010 ; DG[SANCO], 2013). D'ailleurs, ces 15 dernières années, la détection de *Vibrio* spp. pathogènes dans les produits halieutiques sénégalais présentés à l'importation dans le marché de l'Union européenne a été à l'origine de cinq alertes sanitaires (Ministère de l'Économie Maritime/D.I.T.P/D.I.C, 2011). En outre, de 1971 à nos jours, le Sénégal a enregistré plusieurs épidémies de choléra dont les quatre dernières ont affecté environ 50 000 personnes, en faisant quasiment un millier de morts. L'origine de la contamination était souvent les aliments et/ou l'eau (Diop et al., 1991 ; Sow et al., 1997 ; Aidara et al., 1998 ; MSPM/OMS/UNICEF/CROIX ROUGE, 2006 ; Ndour et al., 2006). Les analyses de laboratoire effectuées au cours de ces épidémies ont souvent montré la coexistence de souches de *Vibrio cholerae* avec des souches pathogènes de *Vibrio parahaemolyticus* (Miyamoto et al., 1969 ; Barker et al., 1974 ; Sow et al., 1997).

En France, l'instruction technique DGAL/SDSSA/2014-487 du 24 juin 2014 (Ministère de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt, 2014), qui abroge la note de service DGAL/SDSSA/MCSI/N2004-8255 du 28 octobre 2004 (Ministère de l'Agriculture, de l'Alimentation, de la Pêche et des Affaires rurales, 2004), fixe la conduite à tenir ainsi que les mesures à appliquer lors des contrôles officiels des produits de la



**Figure 1.** Tendances des débarquements de la pêche artisanale et de la consommation en produits frais de 2000 à 2011 — *Trends of artisanal landings and fresh products consumption from 2000 to 2011* (Source: DPM).

ciels des produits de la pêche et des coquillages contaminés par des *Vibrio*. Pour sa part, le comité du codex sur l'hygiène alimentaire, lors de sa 37<sup>e</sup> session tenue à Buenos Aires, en Argentine en mars 2005, a considéré *V. parahaemolyticus* comme un important pathogène bactérien véhiculé par les produits halieutiques (FAO/OMS, 2005 ; Martinez-Urtaza et al., 2005).

Le genre *Vibrio* contient une dizaine d'espèces pathogènes pour l'homme. Mais celles qui sont les plus citées dans les maladies d'origine alimentaire

sont *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* et *Vibrio vulnificus* (FAO/OMS, 2010 ; López-Hernández et al., 2014 ; Haendiges et al., 2015). L'espèce la plus connue est *V. cholerae*, l'agent du choléra, qui peut se retrouver aussi bien dans les eaux douces que dans les milieux marins et estuariens (Alam et al., 2014), alors que les autres espèces du genre sont inféodées aux environnements marins et estuariens. Les souches de *V. parahaemolyticus* possédant au moins un des gènes d'hémolysine à l'origine de leur pathogénicité (hémolysines TDH et/ou TRH) et *V. cholerae* sont principalement isolés dans des cas de gastro-entérite imputables à la consommation d'aliments contaminés ou d'eau contaminée (*V. cholerae*). La recherche des gènes codant pour les hémolysines TDH ou TRH est indispensable pour prouver le caractère pathogène de *V. parahaemolyticus*, alors que le gène *tlh* est présent dans toutes les souches de *V. parahaemolyticus* (Peterson, 2000). Concernant *V. cholerae*, les souches reconnues responsables du choléra sont celles appartenant aux sérogroupes O1 et O139 ou les souches de *V. cholerae* non O1 ou non O139, mais possédant le gène *ctx* codant pour la toxine cholérique. L'étude de leur sérologie et/ou la détection du gène *ctx* sont indispensables pour établir leur caractère pathogène ou non. *Vibrio vulnificus* est principalement signalé comme la cause d'infections extra intestinales (septicémies, blessures, etc.) et les cas de septicémie primaire dus à *V. vulnificus* sont souvent associés à la consommation de produits de la pêche (FAO/OMS, 2009b). Ainsi, la présence de souches pathogènes de *Vibrio* spp. dans les produits de la pêche est devenue une préoccupation majeure dans le cadre du commerce international des produits de la pêche régi par des normes sanitaires réactualisées et strictes (FAO/OMS, 2009a ; FAO/OMS, 2009b ; WHO/FAO, 2011 ; Wang et al., 2015).

La présente étude a été menée dans une entreprise sénégalaise spécialisée dans la transformation et l'exportation de produits halieutiques. Le but visé était d'étudier l'impact des mesures d'hygiène et des traitements assainissants sur la maîtrise du risque lié

aux espèces pathogènes du genre *Vibrio*, notamment *V. parahaemolyticus*. Ceci, aux fins de contribuer à la réduction des alertes sanitaires dues à ces pathogènes.

## 2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

Ce travail a été mené au Sénégal entre avril 2005 et aout 2007, dans un établissement de traitement et d'exportation de produits halieutiques. Les produits traités dans cette entreprise proviennent des grandes zones de débarquement situées le long du littoral du Sénégal (**Figure 2**) : Saint Louis au Nord, Dakar et la petite côte (Mbour-Joal-Djifffer) au Centre et Ziguinchor au Sud.

### 2.1. Échantillonnage

L'étude a consisté à rechercher les souches pathogènes de *Vibrio* spp. dans les produits élaborés destinés à l'exportation (crevettes et filets de poisson). Les échantillons étaient prélevés au hasard sur le stock de produits finis congelés (boîtes de 1 kg ou de 2 kg par échantillon). Après prélèvement au niveau de la section démoulage des produits congelés, les échantillons ont été placés dans des glacières isothermes et acheminés au laboratoire pour y être analysés dans les quatre heures



**Figure 2.** Carte administrative du Sénégal — Administrative map of Senegal.

Les flèches indiquent les zones de provenance des échantillons qui font partie des plus importantes zones de débarquement du pays — Arrows indicate samples areas origins which are among the most important fishing areas in the country.

(délai au cours duquel le produit devait décongeler au réfrigérateur).

Au total, 101 échantillons ont été prélevés dont 25 de crevettes entières, 45 de crevettes décortiquées, 22 de filets de sole et 9 de filets de rouget.

Les résultats obtenus après analyse des 101 échantillons poussèrent le département qualité et productions de l'entreprise à modifier le procédé de fabrication des produits élaborés. Un contrôle portant sur 26 échantillons fabriqués avec le nouveau procédé a été effectué de septembre 2007 à novembre 2008. Les 26 échantillons qui ont été prélevés au hasard sur le stock de produits finis se composaient de 20 échantillons de crevettes décortiquées et de 6 échantillons de crevettes entières.

## 2.2. Analyse microbiologique

**Préparation de l'échantillon.** La méthode ISO 8914:1990 (ISO 8914:1990, 1990) a été utilisée pour l'isolement et l'identification des souches. Quelques modifications ont été apportées à cette technique, comme indiqué sur la **figure 3** :

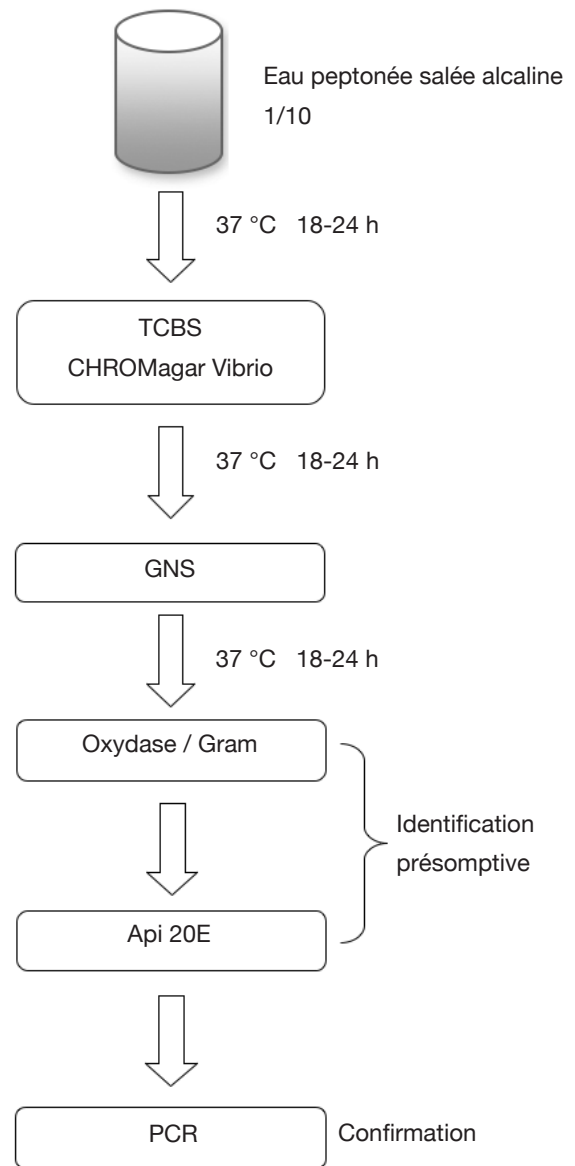
- le milieu d'isolement dénommé gélose à la tryptone, à la peptone de soja et au chlorure de triphényltétrazolium (TSAT) a été remplacé par le milieu CHROMagar™ Vibrio (meilleure discrimination des *Vibrio*) ;
- les galeries Api 20E (BioMérieux, France) ont été préférées aux galeries biochimiques classiques très fastidieuses dans leur mise en œuvre, puisque comportant un grand nombre de tubes à essais à ensemercer et à incubé.

Vingt-cinq grammes de chaque échantillon ont été prélevés aseptiquement, découpés à l'aide de ciseaux stériles, puis placés dans un sac stomacher et broyés dans un stomacher (HUMEAU laboratoires, France) avec 225 ml d'eau peptonée salée alcaline (3 % NaCl, pH 8,6). Le mélange a été incubé à 37 °C pendant 24 h : c'est l'enrichissement.

**Ensemencement sur milieux d'isolement TCBS et CHROMagar™ Vibrio.** À partir de la culture obtenue avec l'enrichissement, la surface d'une gélose TCBS et de CHROMagar™ Vibrio a été ensemençée puis incubée à 37 °C pendant 24 h.

Sur milieu TCBS, les colonies vertes (saccharose négatif : **figure 4**) sont présumées appartenir à l'espèce *V. parahaemolyticus* ou à *V. vulnificus*, alors que les colonies jaunes (saccharose positif : **figure 4**) sont présumées appartenir à l'espèce *V. cholerae* ou à l'espèce *Vibrio alginolyticus*.

Sur milieu CHROMagar™ Vibrio, les colonies violettes (**Figure 5**) sont présumées appartenir à l'espèce *V. parahaemolyticus*, alors que les colonies

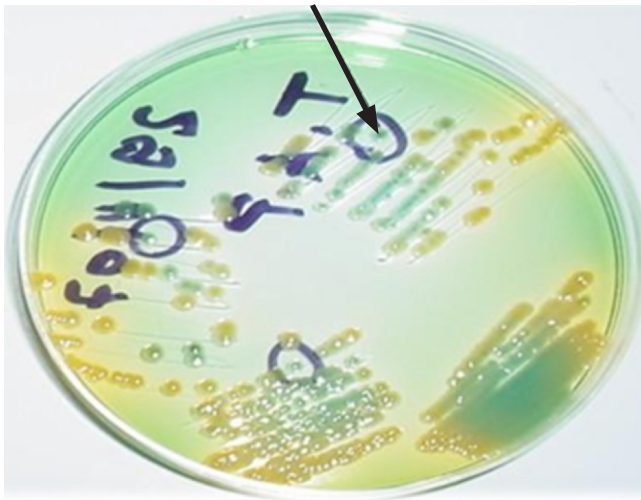


**Figure 3.** Schéma général de la méthode ISO 8914:1990 modifiée pour les besoins de l'étude — *General scheme of ISO 8914:1990 method modified for this study.*

bleues sont présumées appartenir à l'espèce *V. cholerae* ou à l'espèce *V. vulnificus*.

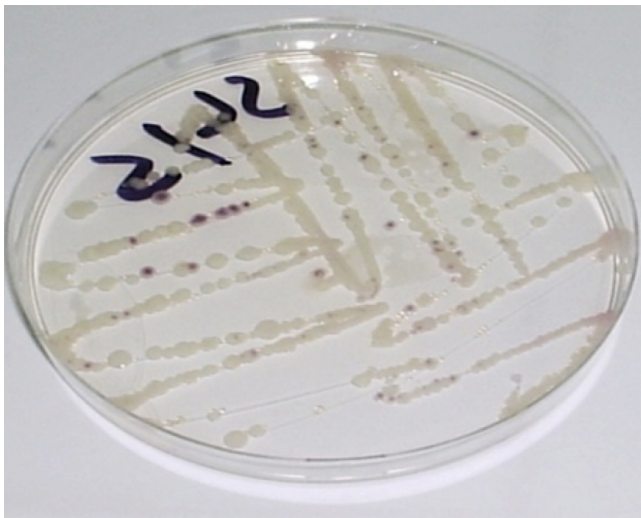
Après incubation, cinq colonies caractéristiques ont été prélevées sur chaque milieu d'isolement et ensemençées séparément sur la surface d'une gélose nutritive salée alcaline et incubée pendant 24 h à 37 °C.

Une colonie bien isolée a été prélevée à partir de chaque boîte de gélose nutritive salée alcaline, puis ensemençée dans un tube de gélose nutritive salée alcaline inclinée. Après incubation à 37 °C pendant 24 h, les cultures pures obtenues ont été utilisées pour les tests présomptifs et les essais biochimiques.



**Figure 4.** Colonies vertes de *Vibrio parahaemolyticus* sur milieu TCBS (flèche) — Green colonies of *Vibrio parahaemolyticus* on TCBS (arrow).

Les colonies jaunes qui sont visibles sur la gélose sont des colonies de *Vibrio alginolyticus* puisqu'aucune souche de *Vibrio cholerae* n'a été isolée sur les produits finis — Yellow colonies that are visible on the agar are colonies of *Vibrio alginolyticus* because no *Vibrio cholerae* strain was isolated on finished products.



**Figure 5.** Deux types de colonies sont visibles à la surface de la gélose (milieu CHROMagar™ *Vibrio*): quelques colonies violacées (*Vibrio parahaemolyticus*) et des colonies blanchâtres majoritaires (*Vibrio alginolyticus*) — Two types of colonies are visible on agar surface (CHROMagar™ *Vibrio*): few violet colonies (*Vibrio parahaemolyticus*) and majority whitish colonies (*Vibrio alginolyticus*).

**Essai à l'oxydase et coloration de Gram.** Une portion de la culture pure a été soumise au test à l'oxydase et à la coloration de Gram. Les souches oxydase positive et Gram<sup>-</sup> ont été retenues pour les tests de mobilité.

**Examen de la mobilité.** Les souches de *Vibrio* spp. ont montré dans leur majorité une mobilité à l'état frais.

Les essais biochimiques ont été réalisés à l'aide des galeries Api 20E qui permettent un gain en temps et en efficacité par rapport aux galeries classiques.

Les souches de *V. parahaemolyticus* et de *V. cholerae* isolées à partir des galeries Api 20E doivent faire l'objet d'investigations supplémentaires.

Après l'identification biochimique des souches de *V. parahaemolyticus*, une caractérisation moléculaire (recherche des gènes *tlh*, *tdh* et *trh*) a été réalisée à l'Institut Pasteur de Dakar.

### 2.3. Caractérisation moléculaire

**Extraction d'ADN.** Les colonies de *V. parahaemolyticus* obtenues sur gélose nutritive salée alcaline ont été mises à incuber à 37 °C toute une nuit en agitation dans un bouillon Luria-Bertani à 2 % NaCl.

Après incubation, 1 ml de la culture a été centrifugé à 10 000 tours pendant 7 min. Après centrifugation, le surnageant a été éliminé et le culot a été dissout dans 300 µl de solution tampon (10 M Tris : 1 m EDTA) puis passé au bain-marie bouillant pendant 10 min. Une centrifugation a ensuite été effectuée à 13 000 tours pendant 5 min, puis le surnageant a été recueilli dans des tubes Eppendorf : c'est l'extrait d'ADN qui a été gardé au frigo entre +2 °C et +4 °C lorsque la PCR devait se faire le même jour. Les extraits d'ADN qui n'ont pas été utilisés le même jour ont été gardés en congélation à -20 °C.

**Analyse PCR.** La détection des gènes *tlh*, *tdh* et *trh* a été réalisée selon le protocole décrit par Bej et al. (1999). Les amorces *tlh* sens et antisens, *tdh* sens et antisens et *trh* sens et antisens qui ont été sélectionnées étaient les suivantes :

- *tlh* (5'-AAAGCGGATTATGCAGAAGCACTG-3' et 5'-GCTACTTTCTAGCATTCTCTGC-3');
- *tdh* (5'-GTAAAGGTCTCTGACTTTTGGAC-3' et 5'-TGGAATAGAACCTTCATCTTCACC-3');
- *trh* (5'-TTGGCTTCGATATTTTCAGTATCT-3' et 5'-CATAACAACATATGCCCATTTCCG-3').

Le mélange réactionnel qui était de 50 µl se composait de : tampon Taq polymérase, 200 µM deoxynucleotide triphosphates, 50 pmol de chaque primer (Proligo, Paris, France), 1 U de Taq DNA polymérase et 25 ng d'ADN. L'amplification PCR a été réalisée dans un thermocycleur 2720 (Applied

Biosystems, The Netherlands) en utilisant les paramètres PCR suivants : dénaturation initiale à 94 °C pendant 5 min, suivie par 35 cycles d'amplification de 94 °C pendant 1 min, 57 °C (*trh*) ou 58 °C (*tlh*, *tdh*) pendant 1 min et 72 °C pendant 1 min, avec une extension finale de 72 °C pendant 10 min. Les produits d'ADN amplifiés ont été séparés par migration électrophorétique conventionnelle sur du gel d'agarose visualisée à l'aide de bromure d'éthyidium.

Les souches de *V. parahaemolyticus* de référence ATCC 43996 (*tdh+*, *trh-*) et AQ 4037 (*trh+*, *tdh-*) ont été utilisées comme contrôle positif dans tous les tests biochimiques et la PCR.

### 3. RÉSULTATS

*Vibrio parahaemolyticus* a été isolé dans 6,9 % des 101 échantillons analysés, comme illustré sur le **tableau 1**. En effet, *V. parahaemolyticus* a été détecté dans 7 échantillons : 3 de crevettes entières, 2 de crevettes décortiquées, 1 de filet de sole et 1 de filet de rouget. En considérant les résultats par type d'échantillon, on constate que *V. parahaemolyticus* a été détecté dans 12 % des échantillons de crevettes entières, 4,4 % des échantillons de crevettes décortiquées, 4,5 % des échantillons de filets de sole et 11,1 % des échantillons de filets de rouget (**Tableau 1**). Les recherches ont été faites uniquement sur le produit fini, c'est-à-dire en fin de processus de fabrication. Toutes les souches de *V. parahaemolyticus* isolées étaient porteuses du gène *tlh* spécifique de l'espèce. Cependant, aucune d'entre elles n'était porteuse de gène de virulence *tdh* et/ou *trh*. La technique d'investigation bactériologique utilisée dans cette étude est basée sur une recherche qualitative (présence/absence) sans dénombrement.

Les résultats obtenus, présence de *V. parahaemolyticus* dans 6,9 % des produits finis congelés, ont été jugés élevés par le département qualité et production de l'entreprise. Le procédé de fabrication a alors été modifié aux fins d'arriver à une réduction du taux de présence de *V. parahaemolyticus* dans le produit fini.

Après modification du procédé de fabrication, des contrôles ont été effectués sur 26 échantillons dont 20 échantillons de crevettes décortiquées et 6 échantillons de crevettes entières (**Tableau 2**). Aucun des 26 échantillons contrôlés n'était porteur de souches de *Vibrio* spp. dès l'étape de l'isolement bactériologique : aucune colonie caractéristique de *V. parahaemolyticus* ou de *V. cholerae* ou de *V. vulnificus* sur TCBS et CHROMagar™ Vibrio.

### 4. DISCUSSION

Sur un total de 101 échantillons analysés, *V. parahaemolyticus* a été isolé dans 6,9 % des échantillons de produits finis, avec un taux d'isolement plus élevé dans la crevette entière (12 %). Ces taux peuvent paraître élevés pour des produits finis fabriqués au sein d'un établissement appliquant le système HACCP (*Hazard Analysis Critical Control Point*). En réalité, cette présence relativement élevée de *V. parahaemolyticus* a été favorisée par un accroissement du risque de contamination croisée lié à une production de crevettes alternée avec des productions de filets de sole et de rouget, sur les mêmes lignes de fabrication. En effet, la crevette peut héberger initialement une importante flore indigène spécifique dont *V. parahaemolyticus* (Liston, 1980 ; Bourgeois et al., 1996). La mesure qui a été prise pour réduire le taux de présence de *V. parahaemolyticus* dans les produits finis était la modification du procédé de fabrication (**Figures 6 et 7**) avec notamment quatre mesures phares :

- renforcement du glaçage précoce de la crevette et maintien de la chaîne du froid des lieux de capture jusqu'à l'usine ;
- séparation dans l'espace ou dans le temps (nettoyage et désinfection efficaces entre deux opérations différentes) de la ligne de production de la crevette des lignes réservées aux autres espèces ;
- renforcement des bonnes pratiques de fabrication et d'hygiène au cours de la manutention et du traitement du produit (hygiène du procédé) ;

**Tableau 1.** Isolement de *Vibrio parahaemolyticus* dans des échantillons de produits halieutiques élaborés entre avril 2005 et août 2007 — *Isolation of Vibrio parahaemolyticus in samples of seafood products between April 2005 and August 2007.*

Échantillons	Origine	Nombre	<i>V. parahaemolyticus</i>			<i>V. cholerae</i>	<i>V. vulnificus</i>
			<i>tlh</i>	<i>tdh</i>	<i>trh</i>		
Crevette entière	Z, M-J, Dj	25	3 (12 %)	0	0	0	0
Crevette décortiquée	Z, M-J, G	45	2 (4,4 %)	0	0	0	0
Filet de sole	S-L	22	1 (4,5 %)	0	0	0	0
Filet de rouget	M-J	9	1 (11,1 %)	0	0	0	0
<b>Total</b>		<b>101</b>	<b>7 (6,9 %)</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

\*Z : Ziguinchor ; S-L : Saint-Louis ; Dj : Djiffèr ; M-J : Mbour-Joal ; G : Gambie.

**Tableau 2.** Résultats des contrôles sur 26 échantillons après la modification du procédé de fabrication — *Results of checks on 26 samples after the modification of the manufacturing process.*

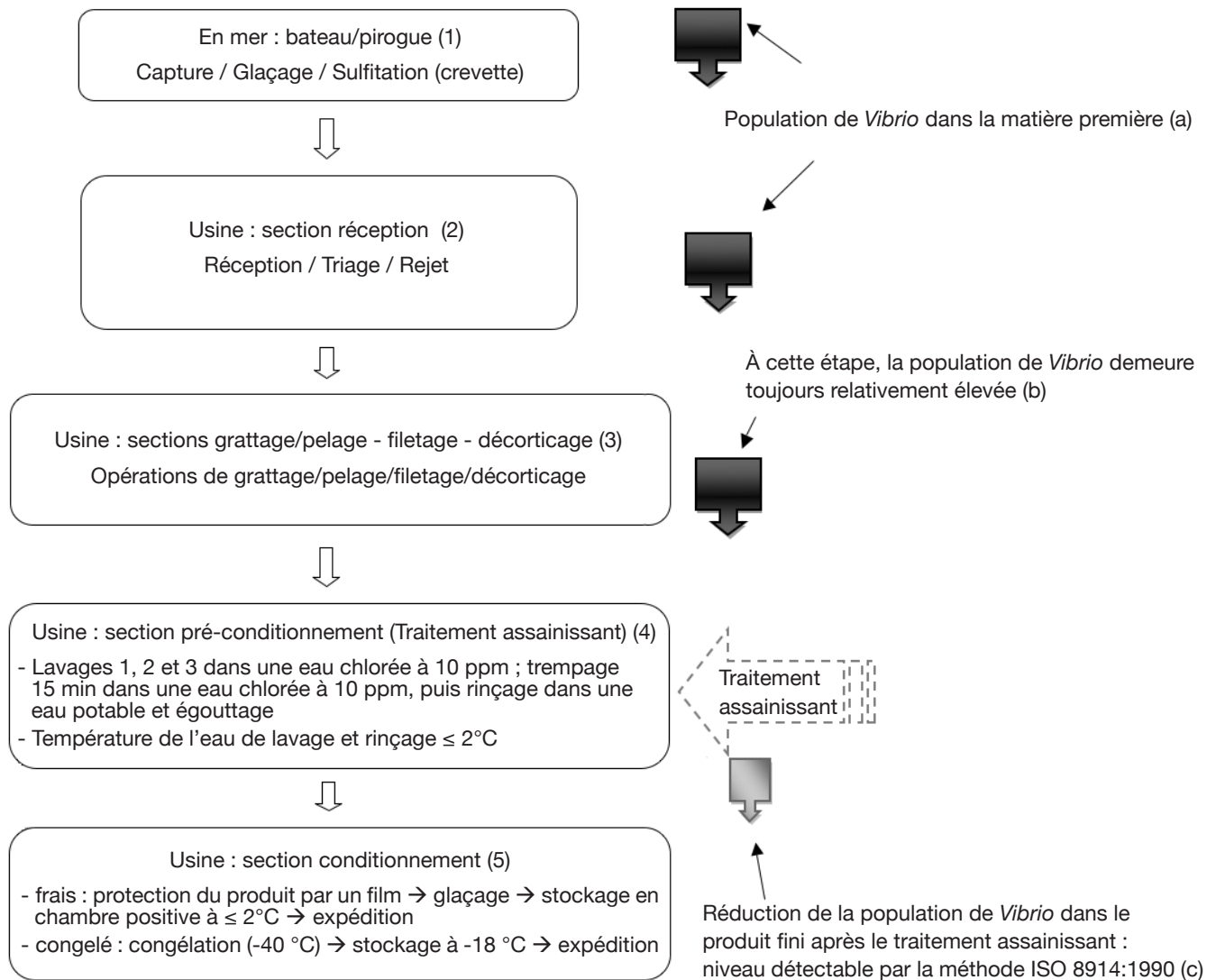
N° ordre	Échantillon	Lot	Origine	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. cholerae</i>	<i>V. vulnificus</i>
1	Crevettes décortiquées	1009073209	Dj	Absence	Absence	Absence
2	Crevettes décortiquées	1109073207	Dj	Absence	Absence	Absence
3	Crevettes décortiquées	1209073103	M-J	Absence	Absence	Absence
4	Crevettes décortiquées	1409073104	M-J	Absence	Absence	Absence
5	Crevettes décortiquées	1709073102	M-J	Absence	Absence	Absence
6	Crevettes décortiquées	1909073104	M-J	Absence	Absence	Absence
7	Crevettes décortiquées	1309073109	M-J	Absence	Absence	Absence
8	Crevettes décortiquées	1309073104	M-J	Absence	Absence	Absence
9	Crevettes décortiquées	110073103	M-J	Absence	Absence	Absence
10	Crevettes décortiquées	410073101	M-J	Absence	Absence	Absence
11	Crevettes décortiquées	810073101	M-J	Absence	Absence	Absence
12	Crevettes décortiquées	1110073404	Z	Absence	Absence	Absence
13	Crevettes décortiquées	711073104	M-J	Absence	Absence	Absence
14	Crevettes décortiquées	1411073201	Dj	Absence	Absence	Absence
15	Crevettes décortiquées	412073204	Dj	Absence	Absence	Absence
16	Crevettes décortiquées	1908082010	Z	Absence	Absence	Absence
17	Crevettes décortiquées	2008082010	Z	Absence	Absence	Absence
18	Crevettes décortiquées	1009083106	Z	Absence	Absence	Absence
19	Crevettes décortiquées	3009082010	Z	Absence	Absence	Absence
20	Crevettes décortiquées	611082010	Z	Absence	Absence	Absence
21	Crevettes entières	3108082010	Z	Absence	Absence	Absence
22	Crevettes entières	1609082010	Z	Absence	Absence	Absence
23	Crevettes entières	2809083102	M-J	Absence	Absence	Absence
24	Crevettes entières	3009082010	Z	Absence	Absence	Absence
25	Crevettes entières	1310082010	Z	Absence	Absence	Absence
26	Crevettes entières	611082010	Z	Absence	Absence	Absence

Dj : Djiffer ; M-J : Mbour-J ; Z : Ziguinchor.

– renforcement des traitements assainissants avec une décontamination efficace à la réception (**Figure 7**) et un renforcement des lavages et des trempages dans une eau glacée ( $t \leq 2^\circ\text{C}$ ), contenant un désinfectant autorisé (le chlore), dans les étapes précédant l'emballage.

Suite aux corrections apportées au premier procédé de fabrication (**Figures 6 et 7**), un contrôle a été réalisé entre septembre 2007 et novembre 2008 pendant les périodes de forte production de crevettes. Le contrôle a porté sur 26 échantillons, comme illustré au **tableau 2**. Les résultats négatifs obtenus dès l'étape 2 de la **figure 3** (isolement sur TCBS et CHROMagar™ *Vibrio* sont révélateurs de l'importance des mesures correctives précédemment citées. En effet, la taille de

la population de *Vibrio* dans le produit fini est passée d'un niveau détectable (**Figure 6**, étape 4) à un niveau indétectable (**Figure 7**, étape 5) par la même méthode de recherche, c'est-à-dire la méthode ISO 8914. Dans le premier procédé de fabrication, comme le montre la **figure 6**, il n'y avait pas de traitement assainissant (pas de lavage ni de trempage) à l'étape réception. La seule étape réservée à l'assainissement du produit (étape de pré-conditionnement) ne permettait pas de réduire la population de *Vibrio* en dessous du seuil de détection par la méthode ISO 8914. Par ailleurs, l'utilisation d'un désinfectant autorisé incorporé dans l'eau de lavage et de trempage a permis de réduire de façon significative la taille de la population de *Vibrio* spp. dans le produit fini. Le désinfectant utilisé est l'hypochlorite de calcium à une concentration maximum de  $10\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ,



**Figure 6.** Diagramme simplifié montrant les grandes étapes (1 à 5) du procédé de fabrication des produits élaborés — *Simplified diagram showing the major stages (1-5) of the elaborated seafood fabrication process.*

Après les lavages 1, 2 et 3, transférer le produit dans des récipients propres pour le trempage ; idem du trempage à l'égouttage — *After the washes 1, 2 and 3, transfer material to clean containers for soaking; ditto from soaking to draining.*

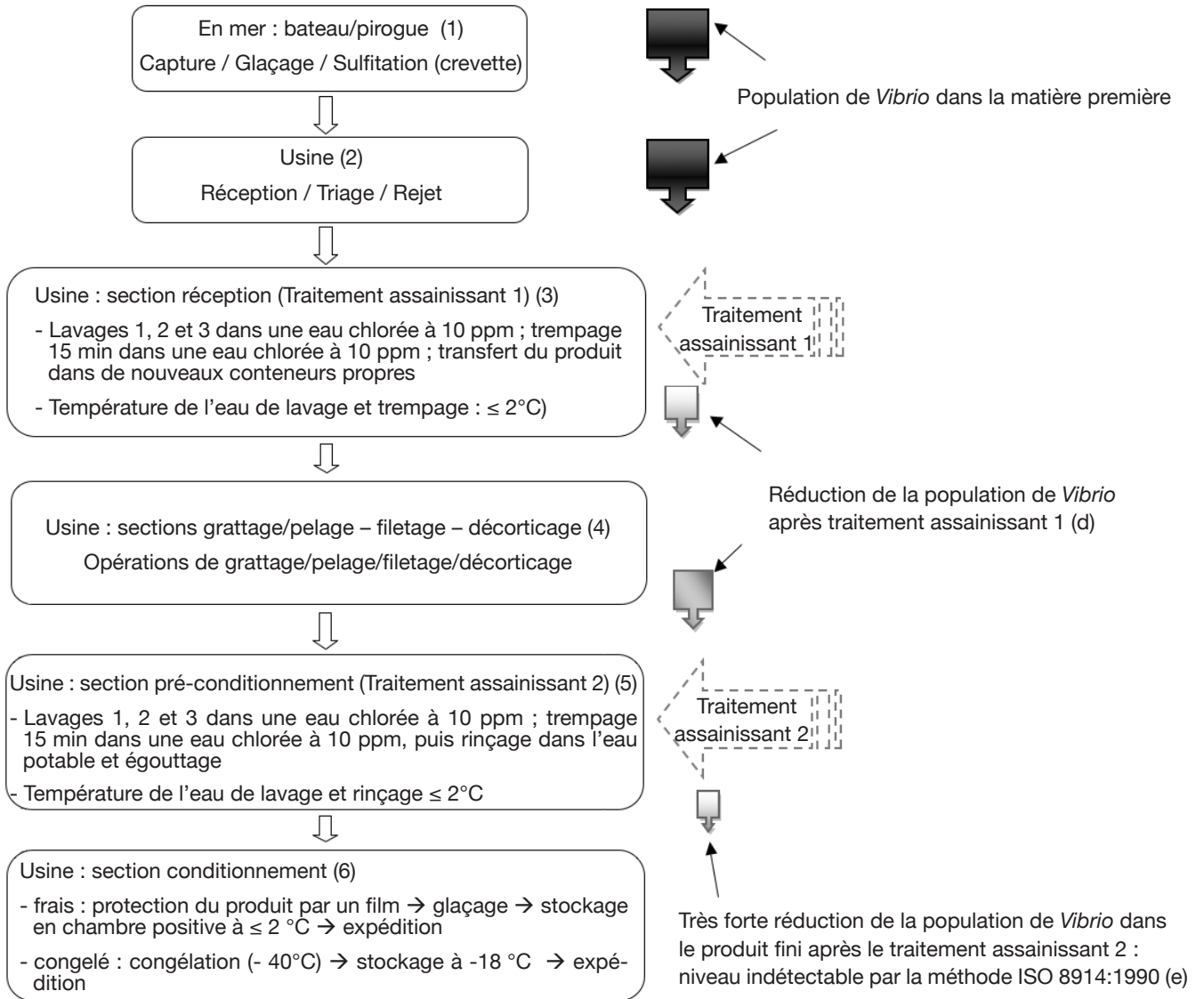
comme recommandé par le Codex Alimentarius (FAO/WHO, 2000 ; FAO/WHO, 2008a ; FAO/OMS, 2012). Par ailleurs, tous les ustensiles, surfaces, plans de travail et films qui sont entrés en contact directement ou indirectement avec le produit ont été préalablement désinfectés avec une solution d'hypochlorite de calcium à 100 ppm, puis rincés avec de l'eau potable ou présentant une faible tension en chlore (1,5 ppm). En effet, la désinfection efficace de toutes les surfaces qui entrent en contact directement ou indirectement avec le produit réduit de façon significative les risques de contaminations croisées qui sont souvent responsables de l'introduction de germes pathogènes en cours de

fabrication (FAO/WHO, 2008b ; Santé Canada, 2009 ; EDES/DITP, 2013).

Les mécanismes par lesquels le chlore agit sur les micro-organismes n'ont pas été entièrement élucidés. Toutefois, d'après bon nombre d'études, la perturbation de la membrane cellulaire et des fonctions vitales du micro-organisme semblent être une étape décisive menant à son inactivation (Bourgeois et al., 1996 ; Santé Canada, 2009). D'après Bourgeois et al. (1996), l'action d'un désinfectant se déroule en quatre étapes principales :

- entrée en contact du désinfectant avec le micro-organisme ;





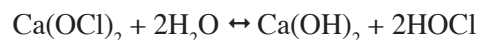
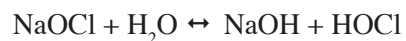
**Figure 7.** Diagramme simplifié montrant les grandes étapes (1 à 6) du procédé modifié (dans le but de réduire la présence de *Vibrio parahaemolyticus* dans le produit fini) — Simplified diagram showing the major stages (1-6) of the amended process (in order to reduce the presence of *Vibrio parahaemolyticus* in the finished product).

Après les lavages 1, 2 et 3, transférer le produit dans des récipients propres pour le trempage ; idem du trempage à l'égouttage — After the washes 1, 2 and 3, transfer material to clean containers for soaking; ditto from soaking to draining.

- fixation du désinfectant sur la paroi du micro-organisme ;
- pénétration du désinfectant à travers la paroi du micro-organisme ;
- action du désinfectant sur le micro-organisme entraînant une perturbation, voire l'arrêt, de ses fonctions vitales.

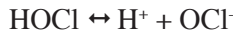
L'efficacité du chlore dépend beaucoup du pH et de la température du milieu aqueux, conditions qui déterminent l'importance de la transformation en l'une ou l'autre des trois espèces chlorées libres, Cl<sub>2</sub>, HOCl et OCl. À un pH faible, le HOCl (acide hypochloreux)

est prédominant et est plus efficace pour inactiver les microbes (Santé Canada, 2009). L'acide hypochloreux est obtenu à partir des réactions chimiques suivantes (WHO/IARC, 1991 ; Connell, 1996 ; White, 1999 ; Santé Canada, 2009) :



$\text{Cl}_2$  : chlore gazeux ;  $\text{Cl}^-$  : ion chlorure ;  $\text{NaOCl}$  : hypochlorite de sodium ;  $\text{Ca}(\text{OCl})_2$  : hypochlorite de calcium.

Le  $\text{HOCl}$  se dissocie ensuite en anion hypochlorite ( $\text{OCl}^-$ ), selon l'équation chimique :



Toutefois, nombreux sont ceux qui soutiennent que l'utilisation du chlore actif dans la production d'aliments devrait être soumise à des lignes directrices strictes en ce qui concerne le type de composant chloré, la concentration du produit, le stade du processus de production où l'utilisation du chlore est permise, la durée maximale d'application et sa fréquence, ainsi que les types d'aliments pour lesquels l'autorisation est accordée. Les pays de l'Union européenne sont opposés à l'utilisation de niveaux élevés de chlore dans l'industrie du poisson, du fait du risque de formation de dérivés chlorés susceptibles de présenter un danger pour la santé des consommateurs ; d'autre part, ils craignent que le chlore ne soit utilisé pour masquer de mauvaises pratiques d'hygiène. Par contre, les États-Unis, le Canada et les pays en développement soutiennent une plus large utilisation du chlore pour assurer une meilleure sécurité alimentaire (FAO/WHO, 2000 ; FAO/WHO, 2008a ; Santé Canada, 2009). Toutefois, le traitement au chlore doit obligatoirement être suivi d'un rinçage à l'eau potable aux fins d'éliminer le chlore résiduel.

Cependant, des études toxicologiques poussées s'avèrent nécessaires sur les niveaux et la réactivité du chlore utilisé dans l'industrie, sur l'identité et la toxicité des dérivés chlorés et sur le niveau d'exposition des consommateurs à ces substances.

Toutes ces investigations réalisées au sein de l'entreprise ont été rendues possibles par l'existence d'un laboratoire interne d'autocontrôle performant, qui participe par ailleurs aux essais d'inter-comparaison organisés par le Réseau d'Analyse et d'Échange en Microbiologie Alimentaire (RAEMA). Néanmoins, il n'existe pas d'essais RAEMA pour *Vibrio*. Fondamentalement, l'obligation de sécurité alimentaire incombe aux professionnels qui ont la responsabilité de mettre en place des autocontrôles fondés sur la démarche HACCP, l'absence ou l'inefficacité des autocontrôles pouvant entraîner une perte de maîtrise inacceptable de la sécurité sanitaire des productions.

La maîtrise du risque lié à *Vibrio* spp. dans les produits de la mer est fortement tributaire du respect de la chaîne du froid et de la réduction de la flore initiale du produit par des moyens de traitement adéquats. Le respect des bonnes pratiques d'hygiène pendant la transformation des produits halieutiques doit permettre d'éviter les contaminations croisées et les recontaminations après traitement assainissant.

Cette démarche est d'ailleurs largement préconisée par les experts du comité mixte du codex sur l'hygiène alimentaire dans différents rapports d'activités (FAO/OMS, 2005 ; FAO/OMS, 2008). La réduction de la charge de *Vibrio* spp. lors du traitement assainissant des produits halieutiques entraîne également une réduction du risque lié aux vibrios pathogènes éventuellement présents. Toutefois, la plupart des souches de *V. parahaemolyticus* isolées des produits halieutiques et de l'environnement sont dépourvues de gène de virulence *tdh* et/ou *trh*. En effet, il est démontré que plus de 99 % de ces souches sont avirulentes (Nishibuchi et al., 1995 ; Islam et al., 2004 ; FAO/OMS, 2005). Néanmoins, quelle que soit l'origine de la souche (clinique ou environnementale), l'analyse PCR est requise pour la détection des gènes de virulence.

En sus des mesures qui doivent nécessairement être prises au sein des établissements de production et d'exportation à travers la mise en place d'un système d'autocontrôle et de validation des procédés de fabrication, le devoir régalien de l'autorité compétente est de contrôler de façon rigoureuse l'application par les professionnels des dispositions réglementaires en matière de sécurité sanitaire des aliments. Par ailleurs, pour une meilleure stratégie de prévention des risques d'alertes sanitaires dues à la détection de souches pathogènes de *Vibrio* spp. dans les produits halieutiques sénégalais exportés en Europe, les structures compétentes de l'État doivent mettre en œuvre ou renforcer les plans de surveillance à quatre niveaux :

- surveillance des productions dans les établissements en réalisant des contrôles microbiologiques et chimiques fréquents ;
- surveillance des résultats d'analyses de tous les laboratoires impliqués dans l'autocontrôle dans le secteur de la pêche (laboratoires internes des entreprises et laboratoires officiels de contrôle) et surveillance de la fiabilité de ces résultats (mise en place d'un réseau d'inter-comparaison) ;
- exploitation et suivi rigoureux des informations ayant trait aux alertes sanitaires ;
- surveillance environnementale.

Les mauvaises habitudes suivantes doivent être bannies par les pouvoirs publics :

- le laxisme noté quand il s'agit de faire respecter les normes sanitaires par les établissements agréés pour l'exportation de produits halieutiques ;
- attendre la « veille » des missions d'inspection de l'Office Alimentaire et Vétérinaire (OAV) de l'UE pour demander aux entreprises de se conformer totalement aux exigences sanitaires.

Fondamentalement, le HACCP et l'autocontrôle demeurent des outils très puissants en production dans

le cadre de la maîtrise des risques microbiologiques et de l'amélioration des procédés de fabrication et de leur validation.

## Bibliographie

- Aidara A. et al., 1998. Phenotypic and genotypic characterization of *Vibrio cholerae* isolates from a recent cholera outbreak in Senegal: comparison with isolates from Guinea-Bissau. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **58**(2), 163-167.
- Alam M.T. et al., 2014. Monitoring water sources for environmental reservoirs of toxigenic *Vibrio cholerae* O1, Haiti. *Emerg. Infect. Dis.*, **20**, 356-363.
- ANSD (Agence Nationale de la Statistique et de la Démographie), 2007. *Note d'Analyse du Commerce Extérieur*. Dakar : ANSD.
- ANSD (Agence Nationale de la Statistique et de la Démographie), 2008. *Note d'Analyse du Commerce Extérieur*. Dakar : ANSD.
- ANSD (Agence Nationale de la Statistique et de la Démographie), 2009. *Note d'Analyse du Commerce Extérieur*. Dakar : ANSD.
- ANSD (Agence Nationale de la Statistique et de la Démographie), 2010. *Note d'Analyse du Commerce Extérieur*. Dakar : ANSD.
- ANSD (Agence Nationale de la Statistique et de la Démographie), 2011. *Note d'Analyse du Commerce Extérieur*. Dakar : ANSD.
- ANSD (Agence Nationale de la Statistique et de la Démographie), 2013. *Situation économique et sociale du Sénégal*. Dakar : ANSD.
- Barker W.H. Jr & Gangarosa E.J., 1974. Food poisoning due to *Vibrio parahaemolyticus*. *Annu. Rev. Med.*, **25**, 75-81.
- Bej A.K. et al., 1999. Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of *tlh*, *tdh* and *trh*. *J. Microbiol. Methods*, **36**, 215-225.
- Bourgeois C.M., Mesclé J.F. & Zucca J., 1996. *Microbiologie alimentaire. Vol. 1 : aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments*. 2<sup>e</sup> éd. Paris : Lavoisier Tec & Doc.
- Connell G.F., 1996. *Water disinfection series: the chlorination/chloramination handbook*. Denver, CO, USA: American Water Works Association.
- DG(SANCO), 2010. *DG(SANCO) 2010-8545 - RM FINAL. Rapport d'une mission effectuée au Sénégal du 27 avril au 6 mai 2010 afin d'évaluer les systèmes de contrôle en place régissant la production des produits de la pêche destinés à l'exportation vers l'Union européenne*. Commission européenne, Direction Générale de la Santé et des Consommateurs.
- DG(SANCO), 2013. *DG(SANCO) 2013-6708 - RM FINAL. Rapport d'un audit effectué au Sénégal du 22 janvier au 1<sup>er</sup> février 2013 afin d'évaluer les systèmes de contrôle en place régissant la production des produits de la pêche destinés à l'exportation vers l'Union européenne*. Commission européenne, Direction Générale de la Santé et des Consommateurs.
- Diop B.M. & Coll-Seck A.M., 1991. Environnement et santé : le choléra à Dakar. *Afr. Med.*, **30**, 251-254.
- EDES/DITP (Direction des Industries de Transformation de la Pêche), 2013. *Guide sectoriel d'autocontrôle (GSAC) pour le secteur Pêche du Sénégal. Version n°1*.
- FAO/COPACE/COREP, 2010. *Rapport de l'atelier sous-régional FAO FISHCODESTP/COPACE/COREP visant à améliorer l'information sur la situation et les tendances des pêches de capture dans le golfe de Guinée, Douala, Cameroun, 15-18 avril 2008*. Rome : FAO, www.fao.org/docrep/012/k7440f/k7440f00.pdf, (20/08/2015).
- FAO/OMS, 2005. *CX/FH 05/37/13. Document de travail sur les stratégies de gestion des risques présentés par Vibrio spp. dans les poissons et fruits de mer, 37<sup>e</sup> session, 14-19 mars 2005, Buenos Aires, Argentine*. Rome : FAO.
- FAO/OMS, 2008. *CX/FH 08/40/1. Programme mixte FAO/OMS sur les normes alimentaires, 40<sup>e</sup> session, 1-5 December 2008, Guatemala City, Guatemala*. Rome : FAO.
- FAO/OMS, 2009a. *CX/FH 09/41/6. Avant-projet proposé de directives sur l'application des principes généraux d'hygiène alimentaires à la maîtrise de Vibrio spp. dans les fruits de mer à l'étape 4, 16-20 Novembre 2009, San Diego, USA*. Rome : FAO.
- FAO/OMS, 2009b. *Alinorm10/33/13. Rapport de la 41<sup>e</sup> session du comité du codex sur l'hygiène alimentaire, 16-20 novembre 2009, San Diego, USA*. Rome : FAO.
- FAO/OMS, 2010. *CAC/GL 73, 2010. Directives sur l'application des principes généraux en matière d'hygiène sur la maîtrise de Vibrio spp. dans les fruits de mer*. Rome : FAO.
- FAO/OMS, 2012. *CAC/RCP 52-2003, 2012. Code d'usages pour les poissons et les produits de la pêche*. 2<sup>e</sup> éd. Rome : FAO.
- FAO/WHO, 2000. The use of chlorine in fish processing: safety and risks. *Infofish Int.*, **3**, 58-62.
- FAO/WHO, 2008a. *Code of practice for fish and fishery products. CAC/RCP 52, adopted 2003, revision 4*. Roma: FAO.
- FAO/WHO, 2008b. *Benefits and risks of the use of chlorine-containing disinfectants in food processing. Report of a Joint FAO/WHO Expert Meeting, 27-30 May 2008, Ann Arbor, MI, USA*. Roma: FAO.
- Haendiges J. et al., 2015. Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* clinical strains from Maryland (2012-2013) and comparisons to a locally and globally diverse *V. parahaemolyticus* strains by whole-genome sequence analysis. *Front. Microbiol.*, **6**, article 125, doi: 10.3389/fmicb.2015.00125
- Islam M.S. et al., 2004. Pandemic strains of O3:K6 *Vibrio parahaemolyticus* in the aquatic environment of Bangladesh. *Can. J. Microbiol.*, **50**, 827-834.

- ISO 8914:1990, 1990. *Microbiology - General guidance for the detection of Vibrio parahaemolyticus. ISO TC 34/SC 9*. France: AFNOR.
- Liston J., 1980. Microbiology in fishery science. In: Connel J.J., ed. *Advanced in fish science and technology*. Farnham, UK: Fishing News book Ltd, 138-157.
- López-Hernández K.M., Pardío-Sedas V.T. & Williams J.J., 2014. Evaluación del riesgo microbiológico a *Vibrio* spp. en alimentos de origen marino en México. *Salud Publ. Mex.*, **56**, 295-301.
- Martinez-Urtaza J. et al., 2005. Pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6, Europe. *Emerg. Infect. Dis.*, **11**, 1319-1320.
- Ministère de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt, 2014. *Instruction technique DGAL/SDSSA/2014-487 du 24 juin 2014*. Paris : Ministère de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt.
- Ministère de l'Agriculture, de l'Alimentation, de la Pêche et des Affaires rurales, 2004. *Note de service DGAL/SDSSA/MCSII/N2004-8255 du 28 octobre 2004. Classement : SSA373/72 et EI 333-62*. Paris : Ministère de l'Agriculture, de l'Alimentation, de la Pêche et des Affaires rurales.
- Ministère de l'Économie Maritime/D.I.T.P/D.I.C, 2011. *Bilan des alertes sanitaires de l'Union européenne de 1999 à 2010 suivies par l'autorité compétente*. Dakar : Ministère de l'Économie Maritime.
- MSPM/OMS/UNICEF/CROIX ROUGE, 2006. *Mission conjointe dans la région de Diourbel : épidémie de choléra au Sénégal*. Dakar : Ministère de la Santé et de la Prévention Médicale du Sénégal.
- Miyamoto Y. et al., 1969. *In vitro* hemolytic characteristic of *Vibrio parahaemolyticus*: its close correlation with human pathogenicity. *J. Bacteriol.*, **100**, 261-266.
- Ndour C.T. et al., 2006. L'épidémie de choléra de 2004 à Dakar : aspects épidémiologiques, cliniques et thérapeutiques. *Med. Trop.*, **66**, 33-38.
- Nishibuchi M. & Kaper J.B., 1995. Thermostable direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus*: a virulence gene acquired by a marine bacterium. *Infect. Immun.*, **63**, 2093-2099.
- Peterson K.M., 2000. Molecular pathogenesis of *Vibrio* infections. In: Cary J.W., Linz J.E., Bhatnagar D., eds. *Microbial foodborne diseases, mechanisms of pathogenesis and toxin synthesis*. Lancaster, PA, USA: Technomic Publishing Co, 157-185.
- PNUE (Programme des Nations Unies pour l'Environnement), 2004. *Mise en œuvre de mesures de conservation et gestion durables des ressources halieutiques : le cas du Sénégal. UNEP/ETP/2004/11*.
- Santé Canada, 2009. *Recommandations pour la qualité de l'eau potable au Canada : document technique – Le chlore. N° de catalogue H128-1/09-588F*. Ottawa, On, Canada : Santé Canada.
- Sow A.I. et al., 1997. Diversité bactérienne au cours de l'épidémie de choléra à Dakar, Sénégal (1995-1996). *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, **90**, 160-161.
- Wang W., Li M. & Li Y., 2015. Intervention strategies for reducing *Vibrio parahaemolyticus* in seafood: a review. *J. Food Sci.*, **80**, 1.
- White G.C., 1999. *Handbook of chlorination and alternative disinfectants*. 4<sup>th</sup> ed. New York, NY, USA: John Wiley & Sons.
- WHO/FAO, 2011. *Risk assessment of Vibrio parahaemolyticus in seafood: interpretative summary and technical report*. Microbiological Risk Assessment Series No. 16. Roma: FAO.
- WHO/IARC, 1991. *Evaluation of carcinogenic risks to humans. Vol 52: chlorinated drinking water, chlorinated by-products, some other halogenated compounds, cobalt and cobalt compounds*. Lyon, France: IARC.

(45 réf.)