

Une épidémie d'intoxications diarrhéiques dues aux fruits de mer à Anvers, Belgique

K. De Schrijver¹, I. Maes¹, L. De Man², J. Michelet³

¹ Gezondheidsinspectie, 1 Antwerpen, Belgique

² Algemene Eetwarensinspectie Itallielei, Antwerpen, Belgique

³ IPH, Reference laboratory for biotoxins, Juliette Wuytsmanstraat, Brussels, Belgique

A Anvers (Belgique), 403 cas d'intoxication liés à la consommation de coquillages ont été rapportés après l'ingestion de moules bleues. Les symptômes incluaient la diarrhée, des vomissements, des douleurs abdominales, et la nausée. L'analyse des échantillons de selles des patients a permis d'exclure tout autre diagnostic bactérien et viral. Les tests biologiques chez la souris ont révélé la présence de biotoxines spécifique des dinoflagellés, mises en évidence et quantifiées par CL-SM. Les moules étaient importées du Danemark, et appartenaient à un lot présentant un taux élevé d'acide okadaïque, au delà des normes autorisées.

Le syndrome diarrhéique lié à l'ingestion de coquillages (DSP, diarrhoeic shellfish poisoning) est une intoxication alimentaire due à la consommation de coquillages contenant des biotoxines fabriquées par les dinoflagellés (algues planctoniques). C'est une infection gastro-intestinale sans symptôme neurologique. Les premiers cas ont été rapportés aux Pays-Bas dans les années 1960 (1). Depuis, des épidémies ont été décrites au Japon, en Europe, en Amérique du Sud et en Extrême-Orient. L'intoxication diarrhéique est provoquée par un groupe de polyéthers, parmi lesquels l'acide okadaïque (AO), les dinophysitoxines (DTX), les pectenotoxines (PTXs), et les yessotoxines (YTXs) (2). Les études de cas bien documentés sont rares en Belgique et en Europe, ce qui peut s'expliquer en partie par le sous-diagnostic et la sous-déclaration. Cet article décrit une épidémie d'intoxication diarrhéique faisant suite à la consommation de moules bleues. L'investigation a débuté lorsque le département des maladies infectieuses de l'Inspection sanitaire (Gezondheidsinspectie) a reçu les déclarations de cas présumés de toxico-infections alimentaires envoyées par différents médecins généralistes.

Matériels et méthodes

Le 1^{er} février 2002, le département de l'inspection sanitaire d'Anvers a été informé de l'apparition d'une maladie suspectée d'être d'origine alimentaire, dans un groupe important d'habitants de Brasschaat et de Schoten, deux villes proches d'Anvers, peu de temps après un repas de moules cuites. D'autres cas ont été rapportés les jours suivants, également associés à la consommation de moules.

L'Inspection sanitaire et le département chargé de la sécurité alimentaire du ministère de la Santé ont mené l'investigation. Un cas était défini comme une infection gastro-intestinale symptomatique chez des personnes résidant près d'Anvers, dans les 12 heures suivant la consommation de moules bleues vendues entre le 29 janvier et le 5 février 2002 dans la région d'Anvers. Un cas probable était défini comme une personne ayant pris un repas incluant des moules. Chez un cas confirmé, l'analyse des échantillons de selles a exclu toute autre cause possible d'intoxication diarrhéique. Les cas ont été rapportés spontanément par les médecins généralistes ou détectés après questionnements.

La présence de bactéries, virus et toxines a été recherchée dans les prélèvements fécaux des patients par les laboratoires universitaires de Louvain et de Liège. Le laboratoire de Bruges (Chemiphar) et le laboratoire alimentaire de Liège ont procédé à l'analyse des échantillons de nourriture, pour détecter la présence de bactéries, virus et toxines. Pour la détection et l'identification des biotoxines, des échantillons de moules fraîches ont été envoyés au laboratoire de référence des toxines marines de l'Institut de santé publique (IPH), à Bruxelles (Belgique), ►

An outbreak of diarrhoeic shellfish poisoning in Antwerp, Belgium

K. De Schrijver¹, I. Maes¹, L. De Man², J. Michelet³

¹ Gezondheidsinspectie Copernicuslaan 1 Antwerpen, Belgium

² Algemene Eetwarensinspectie Itallielei, Antwerpen, Belgium

³ IPH, Reference laboratory for biotoxins, Juliette Wuytsmanstraat, Brussels, Belgium

In Antwerp, Belgium, 403 cases of diarrhoeic shellfish poisoning were reported after consumption of blue mussels. Symptoms included diarrhoea, vomiting, abdominal pain, and nausea. The analysis of faecal specimens from patients allowed diagnosis exclusions for bacteria and viruses. Mouse-assays revealed the presence of biotoxins specific of dinoflagellates, which were identified and quantified by LC-MS. The mussels were imported from Denmark, and were part of a batch presenting high concentrations of okadaic acid above the regulatory limits.

Diarrhoeic shellfish poisoning (DSP) is a foodborne illness caused by the consumption of shellfish which contain biotoxins elaborated by planktonic algae (marine dinoflagellates). It is a gastrointestinal disease with no neurological symptoms. The first reported cases were in the Netherlands in the 1960s (1). Since then, outbreaks have been described in Japan, Europe, South America, and the Far East. DSP is caused by a group of polyethers, including okadaic acid (OA), dinophysitoxins (DTXs), pectenotoxins (PTXs), and yessotoxin (YTXs) (2). Well documented cases in Belgium and Europe are rare, and this may partly be due to under-diagnosis and underreporting. This report describes an outbreak of diarrhoeic shellfish poisoning after the consumption of blue mussels. The investigation was begun after a mandatory notification of several cases of presumptive food poisoning by general practitioners (GPs) to the Health Inspection's department of infectious diseases (Gezondheidsinspectie).

Materials and methods

On 1 February 2002, the Antwerp Department of the Health Inspection was notified that a presumptive foodborne illness had occurred in an large group of inhabitants of Brasschaat and Schoten, two towns in the vicinity of Antwerp, shortly after they had eaten boiled mussels. In the days that followed, other cases were notified which were linked with the same food item.

The investigation was carried out by the Health Inspection and by the food department of the ministry of health. The case definition used was gastrointestinal disease with symptoms that occurred in people living near Antwerp, within 12 hours of consuming blue mussels sold between 29 January and 5 February 2002 in the region of Antwerp. A probable case was defined as a person who ate a meal including mussels. In a confirmed case, faecal specimens excluded other possible causes for the clinical symptoms. Some GPs reported cases spontaneously, and others reported cases after questioning.

Faecal specimens from patients were analysed for the presence of bacteria, viruses, and toxins at the university laboratories of Leuven and Liege. Food samples were analysed for bacteria, viruses, and toxins at the laboratory of Brugge (Chemiphar) and the food laboratory of Liege. Samples of fresh mussels were sent to the Belgian reference laboratory for marine toxins at the Institute of Public Health (IPH) in Brussels (Belgium), to the Marine Institute in Dublin (Ireland), and to the European reference laboratory for biotoxins in Vigo (Spain) for detection and identification of biotoxins. The presence of biotoxins in the mussels was ►

► au Marine Institute de Dublin (Irlande) et au Laboratoire européen de référence des biotoxines à Vigo (Espagne). La recherche de biotoxines dans les moules a été effectuée par des tests biologiques chez la souris (protocole de Yasumoto de 1984, modifié pour une application sur la totalité des tissus des moules), et l'analyse chimique a été réalisée par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (CL-SM) (3,4).

Résultats

En tout, 403 cas répondant à la définition de cas d'une gastro-entérite ont été notifiés (figure). Les symptômes apparaissaient rapidement (une demi-heure à trois heures) et se caractérisaient par des vomissements, des douleurs abdominales, des nausées et une diarrhée. La guérison complète est intervenue en deux jours. Une personne a été hospitalisée pour des gastralgies aiguës. L'âge des patients variait entre 5 et 83 ans. Aucun cas n'a été documenté en dehors de la province d'Anvers. Les habitants qui n'avaient pas consommé de moule n'ont pas présenté de symptômes de gastro-entérite. Les symptômes étaient moins sévères pour les personnes ayant consommé quelques moules seulement.

L'analyse bactériologique et virale des prélèvements fécaux des patients n'a pas permis d'isoler de *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *E. coli*, *Campylobacter*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Rotavirus*, SRSVs (small round structured viruses), ni d'entérotoxines staphylococciques.

L'investigation environnementale

Les moules consommées faisaient partie d'un approvisionnement de 40 tonnes de moules danoises (*Mytilus edulis*) importées pour la vente dans les supermarchés d'Anvers. Les moules ont été élevées et pêchées au Danemark, pour être importées et vendues en Belgique.

Les échantillons de moules crues provenant du lot incriminé collectés dans les supermarchés ont donné des résultats négatifs aux tests microbiologiques et virologiques de routine, de même que pour les recherches d'entérotoxines staphylococciques (par Chemipharm Bruges, et le laboratoire virologique de référence de l'université de Liège). Les tests biologiques chez la souris pour la présence d'acide okadaïque, de dinophysistoxines, de pectenotoxines, de yessotoxines et d'azaspiracide dans les échantillons étaient positifs, avec l'apparition d'une prostration, d'hypothermie et de tachycardie chez l'animal, le décès survenant entre deux et cinq heures après une injection intrapéritonéale. La technique de CL-SM a confirmé les résultats du test biologique. L'azaspiracide (AZA-1) a été isolé dans les échantillons de moules avec une concentration de 5,9 microgrammes/kg de viande. L'acide okadaïque dans sa forme libre avait une concentration de 229 microgrammes/kg de viande, et sous forme conjuguée de diolester, une concentration de 300 microgrammes équivalents OA/kg de viande. En spectrométrie, un pic correspondant à la pectenotoxine PTX-2SA a été mis en évidence, mais cette toxine n'a été quantifiée.

En conclusion, l'azaspiracide a été isolé dans les échantillons mais en petites quantités, en dessous du seuil autorisé, alors que des acides okadaïques ont été détectés, à des taux supérieurs aux normes autorisées, à des concentrations suffisantes pour entraîner une intoxication chez l'homme et notamment un syndrome diarrhéique lié à l'ingestion de coquillages.

Les mesures de lutte ont inclus le retrait de la vente du lot restant des

► investigated by mouse bioassay (Yasumoto protocol 1984, modified to be applied to whole mussel tissues), and chemical analysis was carried out with a liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) (3,4).

Results

In total, 403 cases meeting the case definition of gastrointestinal disease were reported (figure). Symptoms were characterised by a short onset (half an hour to three hours), vomiting, abdominal pain, nausea, and diarrhoea. Patients made a complete recovery within two days. One individual was admitted to hospital for extreme abdominal pain. The age range of the patients was 5 to 83 years. There were no documented cases outside the province of Antwerp. Household members who did not consume mussels exhibited no symptoms of gastrointestinal disease. The symptoms were less severe in patients who ate only a few mussels.

Bacteriological and viral examination of various faecal specimens from the patients tested negative for *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *E. coli*, *Campylobacter*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Rotaviruses*, SRSVs (small round structured viruses), and staphylococcal enterotoxins.

Environmental investigation

The mussels consumed were part of a supply of 40 tons of Danish mussels (*Mytilus edulis*) imported for sale in supermarkets in Antwerp. The mussels were cultivated and harvested in Denmark, imported, and sold in Belgium.

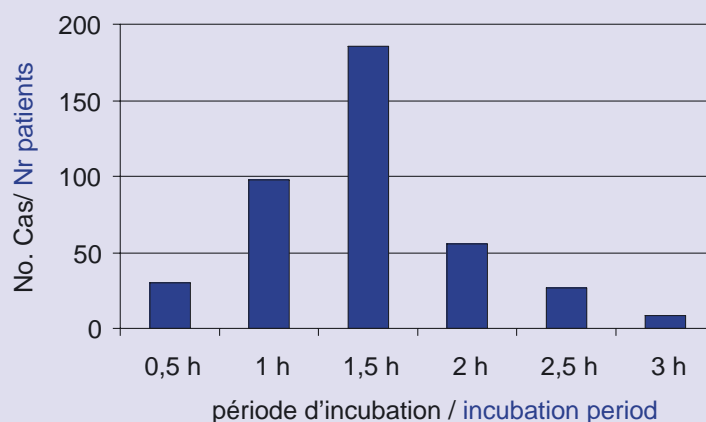
Laboratory examination of raw mussels from the implicated batch collected from supermarkets had negative results for the routine microbiological and virological analyses, as well as for the detection of staphylococcal enterotoxins (by Chemipharm Brugge, and the Virological Reference laboratory of the university of Liege). The mouse bioassay for the presence of okadaic acid, dinophysistoxins, yessotoxin, pectenotoxins, and azaspiracid in the samples showed a positive result, with prostration, hypothermia, tachycardia, and death between 2 to 5 hours after intraperitoneal injection. The LC-MS technique confirmed the results of the bioassay. Azaspiracid (AZA-1) was found in the samples of the mussels at a concentration of 5.9 micrograms/kg of meat. Okadaic acid in the free form had a concentration of 229 micrograms/kg of meat, okadaic acid (conjugated form as diolester) 300 micrograms OA equiv/kg meat, and in spectrometry, a significant peak corresponding to pectenotoxins PTX-2SA was observed, but this toxin could not be quantified.

In conclusion, azaspiracid was present in the samples, but in low amounts and below the regulatory limit, whereas okadaic acids were detected at levels above the regulatory limit, and in concentrations which would cause human intoxication, and lead to diarrhoeic shellfish poisoning.

Control measures implied withdrawing the remainder of imported mussels from sale, and issuing the international European Union's alarm for early warning. Specific information was released for consumers in Belgium.

Figure 1

Cas de DSP après la consommation de moules, à Antwerp, Janvier-Février 2002
Cases of DSP after consumption of mussels, Antwerp, January-February 2002.



moules importées et le déclenchement de la procédure d'alerte précoce de l'Union européenne. Des informations spécifiques ont été rédigées à l'attention des consommateurs belges.

Discussion

Le syndrome diarrhéique lié à l'ingestion de coquillages est probablement sous-diagnostiqué et sous-déclaré en Belgique et en Europe en général, à cause de ses symptômes non spécifiques, et parce qu'il s'agit d'une maladie bénigne et spontanément résolutive. Cependant, cette épidémie a eu d'importantes répercussions économiques en raison du taux élevé de morbidité. Le diagnostic s'est fondé sur l'observation du tableau clinique, l'absence d'autres agents pathogènes et le contexte épidémiologique lié à l'alimentation. Le DSP a été confirmé grâce à une collaboration internationale entre différents laboratoires de référence européens, et par la mise en évidence de concentrations élevées d'acide okadaïque dans les aliments incriminés épidémiologiquement. L'azaspiracide a également été détecté, mais à un niveau inférieur au seuil légal. Cette épidémie illustre la vulnérabilité de la chaîne alimentaire, pour les moules et les fruits de mer. Le suivi de l'épidémie et les relations entre les autorités sanitaires au niveau international ont permis d'en limiter les conséquences.

L'ingestion de fruits de mer contaminés provoque des symptômes variables selon les toxines présentes, leur concentration et la quantité de coquillages contaminés consommés. En dehors du syndrome diarrhéique, il existe quatre autres types communs d'intoxications dues à des biotoxines : les intoxications paralytiques, neurotoxiques, amnésiques et l'intoxication à l'azaspiracide. La PSP (paralytic shellfish poisoning, intoxication paralytique due aux coquillages), due à l'ingestion de dérivés de saxitoxine, se manifeste principalement par des symptômes neurologiques comme des picotements, un échauffement, des vertiges et un discours incohérent. L'ASP (amnesic shellfish poisoning, intoxication amnésique), provoquée par l'acide domoïque, se caractérise par des troubles gastro-intestinaux et des symptômes neurologiques incluant confusion, perte de mémoire, désorientation, crises et coma. L'intoxication neurotoxique due aux fruits de mer est liée à une exposition aux polyéthers, notamment les brevetoxines.

Les patients atteints de DSP présentent généralement des troubles gastro-intestinaux assez bénins : nausées, vomissements, diarrhée et gastralgie, auxquels s'ajoutent des frissons, des céphalées et une fièvre. L'apparition des symptômes dépend de la dose de toxines et peut varier de 30 minutes à 2-3 heures. Une guérison complète est possible en trois jours (2), après un traitement symptomatique et d'appoint.

Les dinoflagelles du genre *Dinophysis* sont responsables des DSP, par la production de biotoxines impliquées dans les intoxications. L'acide okadaïque est une biotoxine lipophile qui inhibe la protéine phosphatase 1 et stimule probablement la phosphorylation qui contrôle la sécrétion de sodium par les cellules intestinales. Cet acide est aussi un inducteur de tumeurs (5,6). Le diagnostic de DSP s'appuie sur les symptômes observés et le récent contexte alimentaire. Il est confirmé par l'identification de la biotoxine dans les coquillages incriminés épidémiologiquement. Les tests biologiques par injection intrapéritonéale des toxines chez la souris sont utilisés pour détecter la présence des toxines, et des analyses chimiques utilisant la chromatographie liquide à haute pression servent à identifier spécifiquement la toxine impliquée.

Dans le but de prévenir les épidémies d'intoxications dues aux fruits de mer, des échantillons de mollusques sont périodiquement collectés et analysés dans les parcs d'élevage. Lorsque le niveau des toxines y dépasse la norme autorisée, les parcs d'élevage sont mis en quarantaine et la vente interdite. L'alerte devrait être donnée aux consommateurs, ainsi qu'aux autorités sanitaires. ■

Discussion

Diarrhoeic shellfish poisoning is probably underdiagnosed and underreported in Belgium and Europe, because of its non-specific symptoms, and because it is a self-limiting, mild disease. Nevertheless, this outbreak had an important economic impact because of high morbidity. The diagnosis was based on the observed clinical picture, the absence of other microbiological findings, and the epidemiological dietary context. The illness was confirmed as diarrhoeic shellfish poisoning thanks to the international collaboration of the different reference laboratories in Europe, and the finding of high concentrations of okadaic acid in the epidemiologically implicated food. Azaspiracid was also detected, but below the regulatory level. This outbreak illustrates the vulnerability of the food chain in the case of mussels and shellfish. The follow up and international contacts between health authorities allowed to prevent further damage.

Ingestion of contaminated shellfish results in a variety of symptoms depending on the toxin present, their concentration in the shellfish, and the amount of contaminated shellfish consumed. Besides diarrhoeic shellfish poisoning, there are four other common types of biotoxin intoxication: paralytic, neurotoxic, amnesic, and azaspiracid intoxication. In paralytic shellfish poisoning (PSP), which is caused by ingestion of derivatives of saxitoxin, neurological symptoms such as tingling, burning, drowsiness, and incoherent speech are predominant. Amnesic shellfish poisoning (ASP), caused by the biotoxin domoic acid, is characterised by gastrointestinal disorders, and neurological symptoms such as confusion, memory loss, disorientation, seizure, and coma. Neurotoxic shellfish poisoning is the result of exposure to polyethers such as brevetoxins.

Patients with DSP have generally quite mild gastrointestinal disorders, such as nausea, vomiting, diarrhoea, and abdominal pain, accompanied by chills, headache, and fever. The onset of the disease depends on the dose of the toxin and can vary from 30 minutes to 2 to 3 hours. Complete recovery is seen within three days (2). Treatment is symptomatic and supportive.

The causative organism of DSP is the marine dinoflagellate *Dinophysis*, which produces the different biotoxins responsible for intoxication. Okadaic acid is a lipophilic biotoxin that inhibits protein phosphatase 1, and probably stimulates the phosphorylation that controls the sodium secretion by intestinal cells. Okadaic acid is also a tumour promoter (5,6). The diagnosis of DSP is based on the observed symptomatology and the recent dietary context, and is confirmed by the identification of the biotoxin in the epidemiologically implicated shellfish. Bioassays with intraperitoneal injection of toxin are used to detect the presence of toxins, and chemical assays, using high performance liquid chromatography are used to specifically identify the causative toxin.

To prevent outbreaks of shellfish poisoning, samples of molluscs in growing areas are periodically collected and tested. When toxin levels are found to exceed the regulatory limit, the growing areas are quarantined and sale prohibited. Warnings should be given to consumers and health authorities. ■

References

1. Aune T, Ynstadt M. Diarrhetic shellfish poisoning. IR Falconer, editor. Algal toxins in seafood and drinking water. London Academic Press; 1993. p87-104.
2. CFSAN. Various Shellfish-Associated Toxins. Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook. Maryland, United States: Center for Food Safety and Applied Nutrition; 1993. (<http://www.cfsan.fda.gov/~mow/chap37.html>)
3. Lee JS, Murata M, Yasumoto T. Analytical methods for determination of diarrhetic shellfish toxins. Natori S, Hahimoto K, Ueno Y, editors. Mycotoxins and Phycotoxins 1988. Amsterdam Elsevier; 1989. p327-34.
4. Lee JS, Murata M, Yasumoto T. Fluorometric determination of diarrhetic shellfish toxins by high performance liquid chromatography. *Agricultural and Biological Chemistry* 1987; **51**: 877-81.
5. Haystead TA, Sim AT, Carling D, Honnor RC, Tsukitani Y, Cohen P, Hardy DG. Effects of the tumour promoter okadaic acid on intracellular protein phosphorylation and metabolism. *Nature* 1989; **337**: 78-81.
6. Tripuraneni J, Koutsouris A, Pestic L, De Lanerolle P, Hecht G. The toxin of diarrhetic shellfish poisoning, okadaic acid, increases intestinal epithelial paracellular permeability. *Gastroenterology* 1997; **44**: 100-8.