

CARACTERISATION MOLECULAIRE DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* ET DE *SALMONELLA* PROVENANT D'ABATTOIRS ET D'ATELIERS DE DECOUPE DE PORC

Inès GIOVANNACCI¹, Jean-Luc VENDEUVRE¹, Gilles SALVAT², Catherine RAGIMBEAU², Stéphane QUEGUINER², Vincent CARLIER³ et Gwennola ERMEL²

¹ CTSCCV, 7 avenue du Général de Gaulle, 94704 Maisons-Alfort Cedex
Tel : 01-43-68-57-85 / Fax : 01-43-76-07-20. E-mail : giovannacci@vet-alfort.fr.

² AFSSA Ploufragan, UR HQPAP, B.P.53, 22440 Ploufragan.

³ ENVA, HIDAOA, 7 avenue du général de Gaulle, 94700 Maisons-Alfort.

Pour répondre à l'impératif de sécurité alimentaire, les professionnels de la transformation de la viande de porc ont élaboré et mis en œuvre depuis plusieurs années des outils d'aide à la maîtrise de la qualité, dont font notamment partie les Guides de Bonnes Pratiques d'Hygiène et la démarche HACCP. La qualité des matières premières demeure un des éléments de maîtrise primordial de la qualité des produits finis. Ainsi, le Centre Technique de la Salaison, de la Charcuterie et des Conserves de Viandes (CTSCCV) a mis en œuvre un programme de recherche, mené en collaboration avec l'Unité Hygiène et Qualité des Produits Avicoles et Porcins (HQPAP) de l'AFSSA Ploufragan, ayant pour but de déterminer l'origine de la présence de *Listeria monocytogenes* et de *Salmonella* sur les produits de découpe de porc.

L'objectif des travaux était d'identifier les sources de contamination par *Listeria monocytogenes* et *Salmonella* des produits de découpe de porc, matières premières carnées des produits de charcuterie-salaison. Les outils de typage moléculaire sont désormais devenus incontournables pour l'étude des sources et voies de transmission des bactéries pathogènes dans les systèmes de production agro-alimentaires. Au cours de ce programme de recherche, des outils innovants de typage bactérien issus de la biologie moléculaire (essentiellement le **pulsotypage**) ont été appliqués à des collections de *Listeria monocytogenes* et de *Salmonella* provenant d'abattoirs et d'ateliers de découpe de porc.

LISTERIA MONOCYTOGENES

MATERIEL ET METHODES

• Collection de *Listeria monocytogenes*

La collection d'isolats de *Listeria monocytogenes*, support de l'étude, a été constituée par l'Institut Technique du Porc (ITP), dans le cadre d'enquêtes de terrain menées en 1995, dans 5 entreprises d'abattage et découpe de porc (E1 à E5). Les prélèvements ont concerné des lots de porcs, des animaux vivants jusqu'aux pièces de découpe secondaire, ainsi que l'environnement des entreprises, en cours d'activité et après nettoyage et désinfection.

Afin d'étudier l'évolution de la contamination environnementale au cours du temps, des prélèvements ont été renouvelés à la fin de l'année 1996, dans l'environnement de deux entreprises, après les opérations de nettoyage et désinfection.

• **Caractérisation des *Listeria monocytogenes***

Au total, 287 isolats de *Listeria monocytogenes* ont été caractérisés principalement par les techniques de **sérotypage** (typage phénotypique classique) et de **pulsotypage** avec *ApaI* (typage moléculaire).

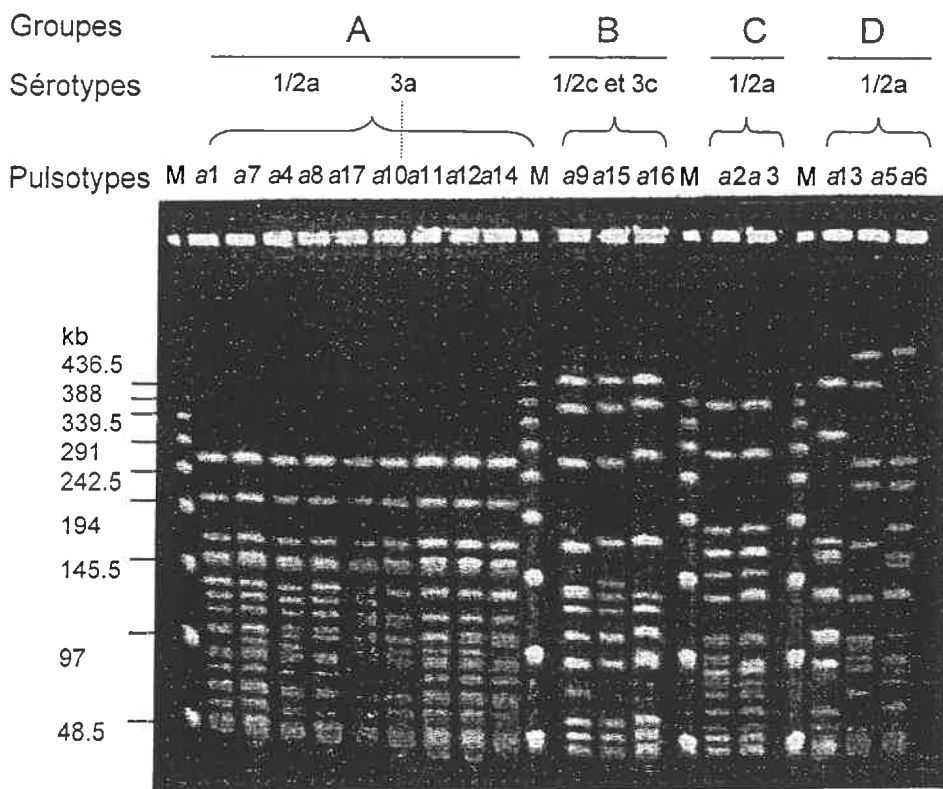
RESULTATS / DISCUSSION

• **Diversité des *Listeria monocytogenes* de la filière porcine**

☞ 4 sérotypes, le 1/2a, 3a, 1/2c et 3c, ont été mis en évidence parmi la collection dont une majorité de 1/2a, sérotype très fréquemment isolé des filières liées à la viande (Jay, 1996).

☞ 17 pulsotypes différents (Figure 1), notés a1 à a17, ont été distingués parmi la collection.

☞ **Aucun pulsotype ne présentait de similarité avec ceux des souches à l'origine des épidémies de listériose de 1992 et de 1993.**



Les lignes M correspondent au marqueur de poids moléculaire (lambda ladder).

Ligne sérotypes : Parmi le groupe génomique A, tous les pulsotypes étaient de sérotype 1/2a, excepté le pulsotype a10 de sérotype 3a.

Figure 1 : 17 pulsotypes *ApaI* obtenus à partir d'une collection de 287 isolats de *Listeria monocytogenes* provenant d'ateliers d'abattage et de découpe de porc.

Malgré la certaine diversité observée (4 groupes génomiques, A à D), le groupe A était largement prédominant et représentait à lui seul près de 90 % des isolats typés. Des pulsotypes très voisins de ceux des souches du groupe A ont été mis en évidence au cours d'autres travaux français, en transformation de viande de porc (Kerouanton *et al.*, 1998 ; Chasseignaux, 1999) ainsi qu'en abattage et découpe de volaille (Radas *et al.*, 1999).

Ainsi, une lignée clonale de *Listeria monocytogenes*, présentant un génotype identique ou proche de ceux rassemblés dans le groupe A, semble largement répandue dans les filières agro-alimentaires et, plus particulièrement, dans les filières liées à la viande.

• Traçabilité des contaminations par *Listeria monocytogenes* dans 5 entreprises.

Le pulsotypage a permis de déterminer une cartographie des contaminations par *Listeria monocytogenes* au sein de 5 entreprises d'abattage et de découpe de porc et de suivre l'évolution de la nature de cette contamination au cours du temps. Seul l'exemple de l'entreprise E5 est traité au cours de cet exposé.

N.b. : Les résultats de cette étude ont été publiés dans leur intégralité dans *International Journal of Food Microbiology* (Giovannacci *et al.* (1999) 53, p. 127-143.) ainsi que dans *Viandes et Produits Carnés* (Giovannacci *et al.*, Novembre-décembre 1999, Vol. 20 (6), p.240-244).

En 1995, dans l'entreprise E5, les prélèvements en abattage et en découpe ont différé de 3 semaines. A l'abattoir, le pulsotype *a1* a été largement représenté. Présent dans l'environnement après nettoyage et désinfection et en cours d'activité, il a été le seul pulsotype retrouvé sur carcasses après ressuyage. Le pulsotype *a5*, provenant des porcs vivants, et le pulsotype *a6*, isolé de l'environnement, étaient marginaux et n'ont jamais été retrouvés par ailleurs. En découpe, le pulsotype *a1* était également largement prédominant, présent à la fois sur les carcasses avant découpe et dans l'environnement après nettoyage et désinfection (ND). Ce type était également présent sur les pièces de découpe primaires et secondaires. Le pulsotype *a2* était présent dans l'environnement après nettoyage et désinfection ainsi que sur les pièces de découpe, mettant en évidence des phénomènes de contaminations croisées entre l'environnement et les produits. Une année plus tard, l'environnement des salles de ressuyage et de l'atelier de découpe après nettoyage et désinfection était toujours contaminé par des souches de pulsotype *a1* ou par des souches très proches (pulsotypes *a4* et *a7*).

CONCLUSION- Origine des *Listeria monocytogenes*

Le pulsotypage a permis de clairement identifier des contaminations croisées entre l'environnement des entreprises et les pièces de découpe. De plus, il a permis de montrer le caractère endémique de la contamination par *Listeria monocytogenes* dans deux entreprises.

Il apparaît que l'origine des *Listeria monocytogenes* présentes sur les pièces de découpe de porc provient de l'implantation de souches de *Listeria monocytogenes* dans l'environnement des entreprises. Ces souches peuvent être apportées par les porcs vivants mais pérennisent du fait de la faible fréquence des opérations de nettoyage et de désinfection, notamment dans les salles de ressuyage et au niveau de zones peu accessibles (rails de convoyage, ventilateurs....).

MATERIELS ET METHODES

• **Collection de *Salmonella***

- *Prélèvements en abattoirs et ateliers de découpe*

Dans le cas de *Salmonella*, 8 séries de prélèvements, réparties au cours d'une année, ont eu lieu dans 2 entreprises : S1 et S2, entreprises à gros volumes d'activité (600 à 800 porcs / h). Pour chaque série de prélèvements menée en cours d'activité, les campagnes ont consisté à suivre un lot de porc provenant d'un élevage donné.

Les prélèvements ont été réalisés sur les porcs vivants, ganglions mésentériques, carcasses à différents stades et sur pièces de découpe (jambon brut, épaules et poitrines découennées et désossées). Parallèlement aux prélèvements sur porc, des prélèvements environnementaux ont été réalisés dans l'environnement juste avant passage du lot de porcs suivi. Au cours de campagnes indépendantes, ces mêmes prélèvements environnementaux ont été réalisés avant reprise des activités le matin dans les entreprises S1 et S2.

- *Recherche et identification de *Salmonella**

La méthode analytique employée était calquée sur la méthode de routine V08-052 légèrement modifiée (Giovannacci *et al.*, 1999). 3 colonies suspectes par boîte d'isolement ont fait l'objet d'une confirmation biochimique. Ainsi, jusqu'à 9 isolats de *Salmonella* par prélèvements positif ont été conservés. Tous les isolats ont été sérotypés.

• **Typage de *Salmonella* Typhimurium (ST) et de *Salmonella* Derby (SD)**

Afin de déterminer les voies de dissémination des 2 sérotypes les plus fréquemment rencontrés, le pulsotypage (avec *SpeI* et *XbaI*) a été appliqué à 390 isolats de *Salmonella* Typhimurium (ST) et 285 isolats de *Salmonella* Derby (SD).

Les profils obtenus ont été analysés avec le logiciel Molecular Analyst (Bio-Rad). Des coefficients de similarité entre profils ont été calculés par l'indice de Dice. Des dendrogrammes ont été construits pour chaque sérotype par la technique d'agrégation Unweighted pair Group Method of Mathematic Average (UPGMA) avec un seuil de tolérance de 1% dans la position des bandes.

RESULTATS / DISCUSSION

• **Résultats de présence de *Salmonella***

En cours d'activité, dans les abattoirs jusqu'au ressuyage, les niveaux de contamination étaient élevés dans les deux entreprises. Les porcs abattus dans S1 ou S2 ont montré un portage asymptotique de *Salmonella*. En découpe, les surfaces environnementales de S1 étaient contaminées mais les pièces de découpe peu. Dans S2, les surfaces et les pièces de découpe ont montré des niveaux de contamination élevé.

Avant reprise des activités, les abattoirs ont montré des sites positifs au niveau de zones restées visiblement souillées par de la matière organique (épileuses, polisseuses...). Dans les salles de ressuyage, les prélèvements positifs provenaient de flaques de sang. En découpe, où les équipements étaient visiblement propres, aucune *Salmonella* n'a été retrouvée le matin.

• **Sérotypage**

Les 300 prélèvements effectués ont permis d'isoler 878 isolats qui appartenait à 8 sérotypes. Typhimurium et Derby étaient largement prédominants, ce qui est classique dans la filière porcine en France et dans d'autres pays (Belgique, USA...). Ces 2 sérotypes ont représenté à eux seuls 75% des isolats collectés. Les autres sérotypes identifiés, Brandenburg, Bredeney, Goldcoast, London et Infantis, sont aussi fréquemment associés à la filière porcine sauf Concord, sérotype plus exotique.

• **Diversité génomique des *Salmonella* Typhimurium et *Salmonella* Derby**

- ***Salmonella* Typhimurium** (Figure2)

20 génotypes, notés t1 à t20, ont été distingués. Ces génotypes ont été regroupés en trois groupes I, II et III au seuil de 80 % de similarité. Le groupe le plus important regroupait tous les génotypes de *Salmonella* rencontrés dans les deux entreprises (S1 et S2) et tous les génotypes associés directement au porc (ganglions mésentériques ou peau).

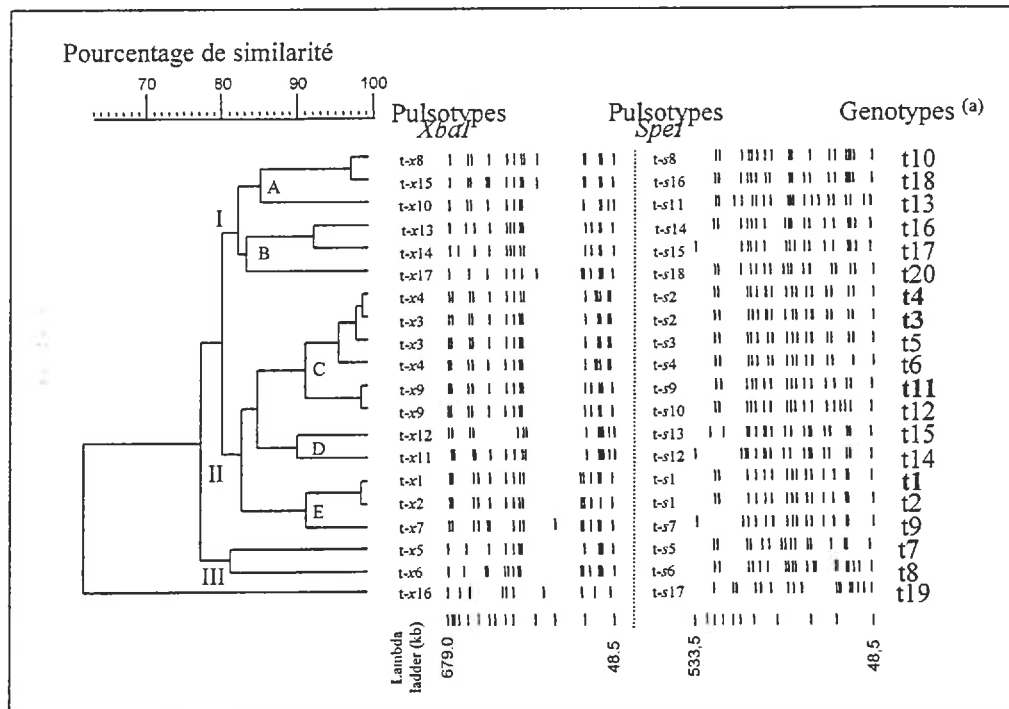


Figure 2 : Représentation schématique des pulsotypes *Spe*I et *Xba*I obtenus à partir de 390 isolats de *Salmonella* Typhimurium et dendrogramme associé (UPGMA, 1% de tolérance).

(a) Les génotypes notés en gras étaient communs aux 2 entreprises S1 et S2.

- *Salmonella* Derby (Figure 3)

16 génotypes, d1 à d16, ont été identifiés, regroupés en deux groupes, I et II. Le génotype d1, associé au porc et très abondant, était présent à la fois dans S1 et dans S2.

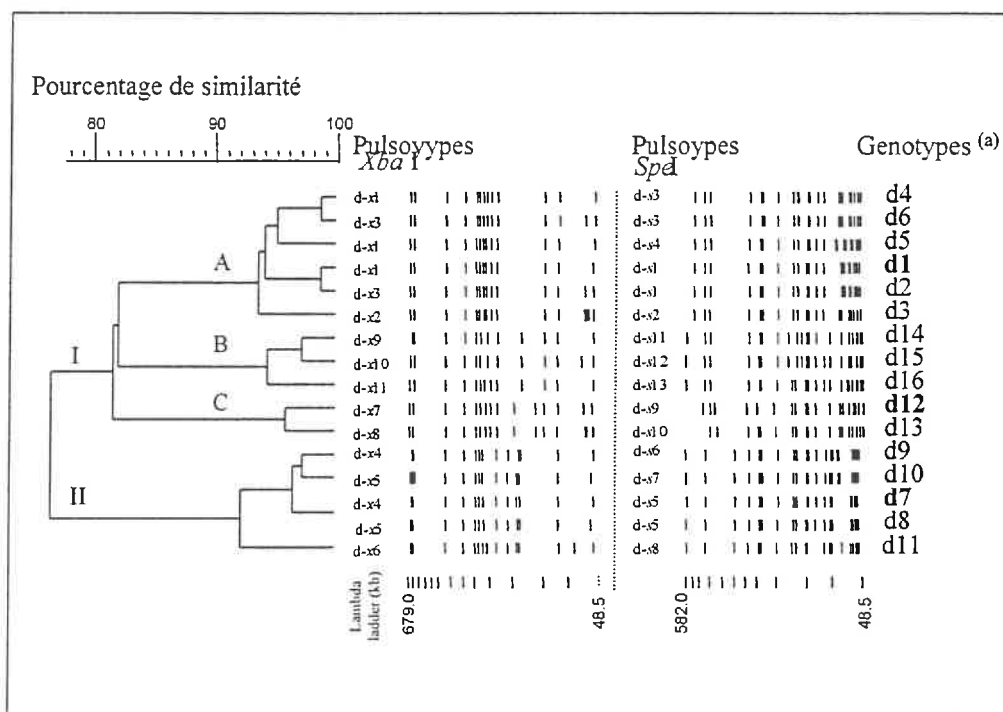


Figure 3 : Représentation schématique des pulsotypes *Spe*I et *Xba*I obtenus à partir de 285 isolats de *Salmonella* Derby et dendrogramme associé (UPGMA, 1% de tolérance). (a) Les génotypes notés en gras étaient communs aux 2 entreprises S1 et S2.

Une relative homogénéité génomique (similarité élevée) a été observée pour des souches de *Salmonella* de même sérotype et isolées d'environnements similaires. Par ailleurs, l'étude de la diversité génomique de *Salmonella* a montré la prédominance, dans les environnements étudiés, de souches de *Salmonella* Typhimurium et de *Salmonella* Derby directement associées aux porcs vivants et sont présents dans les 2 entreprises. Les 2 entreprises, géographiquement proches, ont pu abattre des lots de porcs issus des mêmes élevages. Ou plus généralement, il se pourrait que ces clones de *Salmonella* soient répandus dans la filière porcine en général.

• **Traçabilité des contaminations par *Salmonella***

Voici un exemple de cartographie de la contamination de l'entreprise S2, au cours d'une série de prélèvements conduite en cours d'activité et d'une série conduite une semaine plus tard, avant reprise des activités le matin :

Avant reprise des activités, fin décembre 1996 étaient présents différents sérotypes : Brandenburg, Bredeney, Goldcoast, au niveau de l'environnement ainsi qu'un génotype d7 (groupe II de SD).

Un mois plus tard dans cette entreprise, les sérotypes et génotypes de *Salmonella* retrouvés en cours d'activité étaient différents. Si le sérotype Brandenburg était présent, il provenait d'un portage asymptomatique des porcs abattus le jour même et n'a été

retrouvé que sur carcasses. Une très bonne concordance entre les génotypes retrouvés dans l'environnement et ceux contaminant les carcasses a pu être constatée. Trois de ces génotypes ont été identifiés au niveau des porcs vivants. Au niveau de la découpe, une journée plus tard, les trois génotypes « porc » ont à nouveau été retrouvés. Les contaminations des pièces de découpe étaient soit identiques aux génotypes de l'environnement, qui pouvaient être tracés jusqu'à l'abattoir, soit à ceux contaminant les carcasses élaborées la veille.

CONCLUSIONS – Origine des *Salmonella*

La contamination des abattoirs-ateliers de découpe par *Salmonella* était composée de pulsotypes variables suivant les séries de prélèvements. Si des *Salmonella* étaient présentes le matin avant reprise des activités, l'ensemble des pulsotypes rencontrés n'a jamais été le même au sein d'une même entreprise. Les souches apparaissaient donc labiles. Les contaminations par *Salmonella* des abattoirs et ateliers de découpe semblent être soumises à un turn-over lié aux lots de porcs abattus.

En conclusion, le typage moléculaire a permis de mettre en évidence la chaîne d'événements suivante concernant la contamination des pièces de découpe de porc (Figure 4).

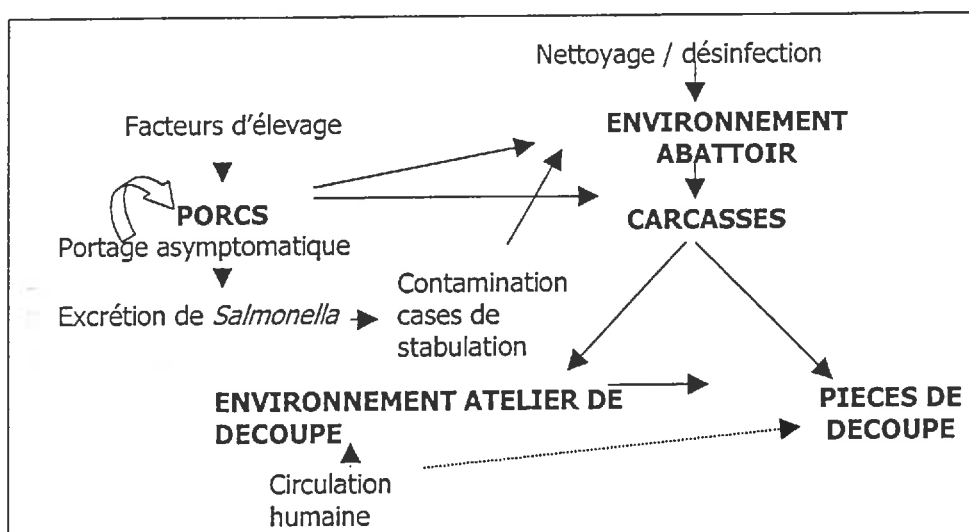


Figure 4 : Voies de transmission des *Salmonella*, de la stabulation des porcs à l'abattoir à la découpe, conduisant à la contamination des produits de découpe de porc.

CONCLUSION

Le typage moléculaire a montré que, pour *Listeria monocytogenes* et pour *Salmonella*, les souches retrouvées sur les pièces de découpe de porc pouvaient avoir une origine première animale et que les contaminations croisées étaient toujours importantes.

Toutefois, l'origine de la présence de chacun des micro-organismes sur les pièces de découpe de porc était différente. Dans le cas de *Listeria monocytogenes*, si les porcs peuvent être porteurs de ce micro-organisme, la contamination environnementale des entreprises a le plus gros impact. Dans le cas de *Salmonella*, c'est la contamination animale qui est prépondérante sur la contamination des pièces de découpe de porc.

PERSPECTIVES

Quel est le devenir des souches de bactéries pathogènes lorsque celles-ci arrivent dans les ateliers de transformation *via* les matières premières carnées ?

Dans la continuité du travail présenté, un programme intitulé « Etude de l'écologie de *Salmonella* et de *Listeria monocytogenes* dans la filière porcine : mise au point d'un dispositif de surveillance de l'abattage à la transformation », mené en collaboration entre l'unité de recherche Hygiène et Qualité des Produits Avicoles et Porcins de l'AFSSA Ploufragan et le CTSCCV, doit permettre d'établir s'il existe des liens entre les souches de *Listeria monocytogenes* et de *Salmonella* présentes sur les matières premières et celles retrouvées dans l'environnement (et les produits) des entreprises de transformation. Les données recueillies au sujet des souches de *Listeria monocytogenes* et de *Salmonella* collectées de l'abattage de porc à la transformation, concernant notamment la diversité génotypique, la diversité des « types » liés aux gènes de virulence et les paramètres écologiques associés, feront l'objet d'une analyse multivariée. Celle-ci devrait fournir un outil pour la construction d'un réseau d'épidémiologie des *Listeria monocytogenes* et *Salmonella* dans la filière porcine, fondé sur des données descriptives et analytiques pouvant conduire à la proposition de moyens de lutte appropriés.

Le typage moléculaire offre désormais de multiples applications, notamment pour l'étude de l'épidémiologie des bactéries pathogènes dans les systèmes de production agro-alimentaires ainsi que pour la réalisation d'enquêtes relatives aux maladies bactériennes d'origine alimentaire.

Le pulsotypage est également devenu un outil de choix pour renforcer les démarches de type HACCP au sein des entreprises (connaissance des profils des souches présentes dans l'entreprise, caractère récurrent ou occasionnel des souches, traçabilité des matières premières aux produits finis, identification des sources et des nids de contamination....)

Le laboratoire de microbiologie du CTSCCV offre la possibilité d'effectuer le pulsotypage de *Listeria monocytogenes* associé à un archivage et une analyse informatisés des données.

Contact : Inès Giovannacci – giovannacci@vet-alfort.fr – CTSCCV, 7, av du Général de Gaulle. 94704 Maisons-Alfort Cedex. Tel : 01-43-68-57-85 / Fax : 01-43-76-07-20.

LEXIQUE

On appelle **isolat** une population de cellules bactériennes en culture pure, provenant d'une colonie isolée sur gélose et qui a été caractérisée jusqu'au niveau de l'espèce (ex : un isolat de *Listeria monocytogenes*).

Un **type** bactérien correspond à un profil généré par l'application d'une technique de typage.

Le typage peut être fondé sur la détermination de caractères **phénotypiques** (exprimés par les bactéries), comme c'est le cas du **sérotypage** (détermination des antigènes de surface somatiques et flagellaires de la bactérie) et du **lysotypage** (détermination de la sensibilité d'un isolat à un ensemble de bactériophages).

De nombreuses techniques de typage très fines, dites génotypiques, utilisant le contenu génétique des bactéries (ADN) ont été développées ces 10 dernières années. Elles consistent à établir des **profils** d'ADN, assimilables à des codes-barres, selon différents principes. En particulier, le **pulsotypage** est une technique génotypique très performante pour le typage de *Listeria monocytogenes* (découpage de l'ADN total et obtention de profils par électrophorèse en champs pulsés de l'ADN).

On appelle **génotype** un ensemble de profils obtenus par différentes techniques de typage. Dans cet article, nous avons toutefois confondu les termes de **pulsotypes** et de **génotypes** puisque nous n'avons fait référence qu'à une seule sorte de technique.

On appelle souche un isolat ou un groupe d'isolats présentant des caractéristiques **phénotypiques** ou **génotypiques** distinctes de celles d'autres isolats de la même espèce. En épidémiologie bactérienne, un **clone** (ou une **lignée clonale**) correspond soit à un génotype donné soit, plus généralement, à un ensemble de génotypes très proches entre eux (ex : dans cette étude, les types aX de *Listeria monocytogenes* rassemblés dans le groupe A).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Chasseignaux, E. (1999) Ecologie de *Listeria monocytogenes* dans les ateliers de transformation de viandes de volaille et de porc. Thèse de Docteur de l'Université Claude Bernard-Lyon I, 12 octobre 1999, Lyon.

Corrégé, I. (1997). Incidence des opérations d'abattage et de découpe des porcs sur la contamination par *Listeria monocytogenes*. *Viandes et Produits Carnés* **18** (6) : 275-282.

Giovannacci, I., Queguiner, S., Ragimbeau, C., Salvat, G., Vendevre, J.L. et Ermel, G. (1999) Origine des *Salmonella* présentes sur les produits de découpe de porc. In Actes du colloque : Les micro-organismes dans les aliments – D'où viennent-ils ? Ont-ils changé ? *Société Française de Microbiologie*, 14 et 15 octobre 1999, Paris.

Jay, J.M. 1996. Prévalence of *Listeria* spp. in meat, poultry products. *Food Control* **7** (4,5) : 209-214.

Kerouanton, A., Brisabois, A., Denoyer, E., Dilasser, F., Grout, J., Salvat, G. et Picard, B. (1998). Comparison of five typing methods for the epidemiological study of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* **43**, 61-71.

Radas, A., Ermel, G., Gérault, P., Salvat, G. et Colin, P. (1999) Evaluation du risque posé par *Listeria monocytogenes* en cours de production dans les abattoirs de volaille. In *Listeria : L'actualité*, 25 novembre 1999, ISPAIA, Ploufragan, 23-31.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100