

Listeria monocytogenes est un germe ubiquiste responsable d'une maladie invasive rare, mais grave, la listériose. À l'heure actuelle, il est considéré comme un agent pathogène important en santé publique puisqu'il est à l'origine d'épidémies alimentaires à travers le monde (Farber and Peterkin, 1991 ; Frye et al., 2002). De récents événements en France et dans d'autres pays Européens ont montré que la viande de porc et les produits carnés à base de porc, comme les produits de charcuterie pouvaient être à l'origine de listériose (Goulet et al., 1998). En fait, de nombreuses études ont montré la présence de *Listeria monocytogenes* tout au long de la chaîne de transformation de la viande de porc, avec une prévalence croissante de l'abattoir aux ateliers de découpe et à l'industrie de charcuterie salaison (Nesbakken et al., 1996). Le saucisson sec est un produit carné non cuit, fermenté et séché issu de la tradition culinaire française. À ce jour, aucun saucisson sec n'a été impliqué dans des cas de listériose. Cependant, la présence de *L. monocytogenes* dans les produits en fin de dessiccation maturation est inquiétante en termes de santé publique. Des recherches bibliographiques ont souligné qu'il existe peu de données françaises publiées sur la prévalence de la contamination des saucissons secs par *L. monocytogenes*. Par ailleurs, les produits intermédiaires obtenus lors de la fabrication ainsi que l'environnement des entreprises n'ont fait l'objet d'aucune investigation. Il en découle qu'aucune caractérisation fine des souches de *L. monocytogenes* isolées en charcuterie n'a été effectuée et donc qu'aucun sérotypage n'a été entrepris afin d'évaluer si ces souches appartiennent aux sérotypes les plus souvent impliqués dans des cas de listériose.

Cette étude avait pour but de faire un état des lieux de la contamination de *Listeria monocytogenes* dans 13 charcuteries salaisons jugées représentatives de la production française. Dans un premier temps, nous avons cherché à évaluer la prévalence de *L. monocytogenes* dans l'environnement de ces entreprises (surfaces de travail après les opérations de nettoyage désinfection et pendant l'activité), mais aussi la viande matière première utilisée et les produits intermédiaires et finis.

Dans un deuxième temps, le sérotypage des souches isolées lors de la première étape a permis de vérifier leur appartenance aux 3 sérotypes (1/2a, 1/2b et 4b), ces derniers étant principalement liés aux cas sporadiques de listériose, et le sérotype 4b étant majoritairement impliqué dans les épidémies.

Listeria monocytogenes

Prévalence de *Listeria monocytogenes* dans 13 charcuteries salaisons et leurs produits

En vue d'évaluer le taux de contamination par *L. monocytogenes* dans treize charcuteries salaisons un état des lieux a été dressé. Les résultats obtenus montrent que la contamination des produits intermédiaires diminue de manière significative au cours des différentes étapes de la fabrication.

THÉVENOT D. ^a, DELIGNETTE-MULLER M.L. ^a,
CHRISTIEANS S. ^b, VERNOZY-ROZAND C. ^b

^aUnité de Microbiologie alimentaire et prévisionnelle,
Ecole nationale vétérinaire de Lyon, B.P. 83,
69280 MARCY L'ÉTOILE, France

^bAdiv, 2 rue Chappe,
63039 CLERMONT-FERRAND cedex 2, France

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Treize salaisons, petites et grandes, sans aucune relation entre elles ont été étudiées (tableau 1). Pour chacune d'elles, un plan de prélèvements dépendant de la taille de l'entreprise, de l'équipement utilisé et des produits fabriqués a été établi et appliqué.

Afin d'évaluer la persistance des souches au sein des entreprises, deux salves de prélèvements ont été conduites, avec au moins 2 semaines d'intervalle.

Nature des échantillons prélevés

Les prélèvements environnementaux ont été réalisés par chiffonnage des surfaces en contact ou non avec les produits manufacturés, après les opérations de nettoyage désinfection et pendant l'activité.

Les prélèvements de matières premières (viandes) ont été faits par excision de la surface des viandes à l'aide d'un scalpel. La mèche, quant à elle a été prélevée à l'aide d'une spatule. Chaque saucisson étudié (issu du même lot) a été placé dans un sac stérile et emporté (jour de la fabrication) ou envoyé par les fabricants (saucissons en fin d'étuvage, fin de sèche et à DLUO) pour être analysé.

L'acheminement des échantillons et leur stockage se sont effectués entre 1 °C et 2 °C. Ils ont été analysés dans les 24 h au plus suivant leur arrivée au laboratoire.

Au total, 1 029 échantillons ont été collectés avec parmi eux : 413 échantillons environnementaux correspondant à des surfaces après les opérations de nettoyage désinfection, 372 autres correspondant à des surfaces pendant l'activité et 244 échantillons de matières premières et de produits à différents stades de fabrication.

Recherche et identification des souches de *L. monocytogenes*

La recherche de *L. monocytogenes* a été réalisée conformément à la norme AfnorV08-055 utilisant deux étapes d'enrichissement successif. Lors de présence de colonies suspectes de *L. monocytogenes*, quatre colonies au moins étaient sélectionnées et identifiées grâce à une galerie biochimique miniaturisée d'identification, le monoconfirmtest. Chaque isolat était ensuite conservé à -80 °C sur des cryobilles ou dans un bouillon nutritif complété par du glycérol.

Sérotypage

Il a été réalisé en utilisant des sérums polyclonaux et monoclonaux commerciaux anti *Listeria* selon les indications fournies par le fabricant. Cette méthode basée sur l'association des antigènes somatiques (O) et flagellaires (H) des bactéries permet de différencier 13 sérotypes chez *L. monocytogenes*.

Analyses statistiques

Les taux de contaminations par *L. monocytogenes* des différentes matrices testées ont été comparés par le test de Chi2 en utilisant le logiciel statistique Software R (version 1.6.1.).

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Contamination des entreprises de charcuteries salaisons

Un total de 785 échantillons a été prélevé sur les surfaces. Avant activité, 15,1 % des surfaces en contact direct avec la viande (machines) et 13,3 % des surfaces sans aucun contact étaient contaminées par *L. monocytogenes*, alors que 25,9 % et 50,9 % de ces surfaces respectives étaient contaminées pendant l'activité. De nombreuses études ont montré que si elles sont appropriées et menées à bien, les opérations de nettoyage désinfection éliminent complètement les souches *L. monocytogenes*. Dans le cas présent, seule une réduction substantielle de la contamination a été observée.

Contamination des équipements avant activité (après les opérations de nettoyage désinfection)

La contamination des machines a permis de classer les entreprises étudiées dans trois groupes différents. Le premier rassemble quatre entreprises dont les machines étaient fortement contaminées à chaque salve de prélèvements. Le deuxième est représenté par un seul atelier, dont les équipements étaient fortement contaminés lors des premiers prélèvements et faiblement contaminés lors des seconds. Le troisième groupe est constitué d'en-

Tableau 1
LES CHARCUTERIES SALAISONS ÉTUDIÉES SONT TRÈS VARIÉES

Salaisons	Tonnage/an	Complexité chaîne de fabrication	Types de produits				Viande crue	
			saucisse	saucisson	rosette	chorizo	fraîche	congelée
A	[4000 - 5000]	+++	2	3			x	x
B	< 1000	++		2			x	x
C	[4000 - 5000]	+++			2			x
D	[1000 - 2000]	+			2		x	x
E	[2000 - 3000]	++		2			x	
F	< 1000	++	1	2			x	x
G	[1000 - 2000]	+	1				x	x
H	[2000 - 3000]	+++				4		x
I/J	[2000 - 3000]	++	1	1	2		x	x
K	< 1000	++		2			x	x
L	< 1000	++				3	x	x
M	< 1000	++		2			x	x
N	< 1000	+		1			x	x

Différentes caractéristiques des 13 charcuteries salaisons étudiées.

Complexité des chaînes de fabrication : +/++/+++ . 1, 2, 3 4 désigne le nombre des différents types de saucisson : saucisse, saucisson, rosette et chorizo produits dans les salaisons.

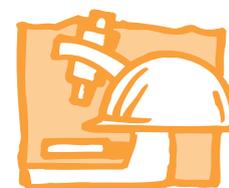


Tableau 2 : LA CONTAMINATION DIMINUE DANS LES PRODUITS EN FIN DE MATURATION

Salaisons		Surfaces des équipements											
		Avant travail			Pendant travail			Viandes crues			Fin de maturation		
		+/total	%	Total %	+/total	%	Total %	+/total	%	Total %	+/total	%	% total
A	E1	4/16	25	36.1	3/5	60	82.3	1/6	20	25	0/2	0	20
	E2	6/18	33.3		5/5	100		3/6	50		0/1	0	
	E3	7/13	53.8		6/7	85		0/5	0		1/2	50	
B	E1	0/10	0	5	3/13	23	26.9	0/3	0	16,6	0/1	0	0
	E2	1/10	10		4/13	30,7		1/3	33,3		0/1	0	
C	E1	6/15	40	30	9/12	75	79.1	2/2	100		ND		ND
	E2	3/15	20		10/12	83.3		3/3	100				
D	E1	0/10	0	0	8/11	72.7	63.6	2/3	66,6	50	ND		0
	E2	0/10	0		6/11	54.5		1/3	33,3		0/1	0	
E	E1	2/15	13.3	6.6	3/12	25	20	1/7	14,2	14,2	1/1	100	50
	E2	0/15	0		2/13	15.3		1/7	14,2		0/1	0	
F	E1	3/14	21.4	12.9	10/14	71.4	48.1	2/7	28,5	41,6	0/2	0	0
	E2	1/17	5.8		3/13	23		3/5	60		0/1	0	
G	E1	0/11	0		6/12	50		1/5	20		0/1	0	
H	E1	6/24	25	22.9	9/16	56.2	60	2/5	40	55,5	0/2	0	0
	E2	5/24	20.8		12/19	63.1		3/4	75		0/2	0	
I/J	E1	1/21	4.7	2.3	10/23	43.4	50	3/3	100	71,4	0/2	0	0
	E2	0/21	0		13/23	56.5		2/4	50		0/2	0	
K	E1	1/16	6.25	3.1	7/14	50	53.5	2/4	50	37,5	1/1	100	50
	E2	0/16	0		8/14	61.5		1/4	25		0/1	0	
L	E1	1/18	5.5	5.5	6/19	46.1	50	3/7	42,8	35,7	0/2	0	0
	E2	1/18	5.5		7/13	53.8		2/7	28,5		0/1	0	
M	E1	4/12	33.3	29.1	4/11	36.3	50	0/7	0	7,7	0/1	0	0
	E2	3/12	25		4/11	63.6		1/6	16,6		0/1	0	
N	E1	0/12	0		1/9	11.1		1/6	16,6		0/1	0	
Grand total		58/383	15.1		162/318	50.9		41/121	33,9		3/30	3	

Contamination des surfaces, de la viande crue et des produits en fin de maturation.

-/- : nombre d'échantillons contaminés par *Listeria monocytogenes* sur le nombre total d'échantillons.

E : Échantillonnage.

ND : Non réalisé.

treprises dont les machines étaient faiblement contaminées par *L. monocytogenes* à chacune des deux phases de prélèvements.

Les entreprises de gros tonnage, classées dans le premier groupe ont montré un taux de contamination (29,5 %) significativement plus élevé que les petites entreprises rassemblées dans le troisième groupe (2,9 %) ($p < 0,0001$) (tableaux 1 et 2). Cette importante contamination des grosses entreprises pourrait être corrélée à des difficultés de nettoyage désinfection des chaînes de fabrication trop complexes ou sophistiquées et des machines dont la conception est incompatible avec une hygiène maîtrisée des surfaces. Nos résultats vont dans le sens d'études antérieures indiquant que les machines complexes sont plus sensibles à la colonisation des souches persistantes de *L. monocytogenes*. Les espaces réduits, les ouvertures étroites, les angles droits, les coudes sont autant de zones difficiles, voire impossibles à atteindre

par des produits de désinfection. Notons par ailleurs, que leur nettoyage est souvent impossible, ce qui participe à l'installation de biofilms importants.

Nos travaux ont également permis de confirmer ces résultats généraux. En effet, la détection de souches de *L. monocytogenes* sur des surfaces a systématiquement été associée à la présence notable de matière organique. La matière organique résiduelle pourrait être en théorie au moins, à l'origine de la contamination des machines, mais également pourrait constituer un substrat pour la colonisation par les germes déjà présents sur les sites étudiés. De nombreux travaux ont démontré par ailleurs, que toute matière organique doit être éliminée des surfaces de travail puisqu'elle réduit l'efficacité des désinfectants en les empêchant d'atteindre les bactéries cibles aux concentrations recommandées, entraînant parfois des réponses adaptatives des pathogènes visés.

Évolution de la contamination des équipements pendant l'activité

La contamination des machines pendant l'activité a augmenté de 15,1 % à 50,9 % avec une importante hétérogénéité entre les différentes salaisons (de 11,1 % à 100 % entre les deux salves de prélèvements). Cette augmentation de la contamination était très certainement rattachable à un apport par la matière première (la viande) et le personnel (mauvaise hygiène des mains). La multiplication des *L. monocytogenes* présentes a certainement participé dans une mesure non négligeable à cette augmentation du taux de contamination des machines en cours d'activité.

Viandes et saucissons

Le taux de contamination global de la viande crue utilisée dans les salaisons était de 33,9 %. Une forte augmentation de ce taux dans les mêlées étudiées (71,6 %) a été

Tableau 3
DES SÉROTYPES TRÈS VARIÉS SONT RETROUVÉS LORS DES DIFFÉRENTS PRÉLÈVEMENTS

Salaisons		Viande crue	Mêlée et saucissons embossés	Saucissons après étuvage	Saucissons après dessiccation maturation
À	E1	1/2c	1/2c	*	*
	E2	1/2a 1/2c	1/2a 1/2b 1/2c 4b	4b	*
	E3	1/2a	1/2a 1/2b 1/2c	*	1/2a
B	E1	*	1/2a	1/2a	*
	E2	1/2c	1/2a	1/2a	*
C	E1	1/2a 1/2c	1/2a Autoa	ND	ND
	E2	1/2a 1/2b 4b	1/2a 1/2b	ND	ND
D	E1	1/2c	1/2b 1/2c	1/2c	*
	E2	1/2a	1/2c	1/2c	*
E	E1	1/2a	1/2a 1/2b	*	1/2b
	E2	1/2a	1/2a	*	*
F	E1	1/2c 4b	1/2c 4b Autoa	4b	*
	E2	1/2a 1/2c	*	*	*
G	E1	1/2b	*	4b	*
H	E1	1/2a 1/2b	1/2a 1/2b 4b	1/2a 1/2b	*
	E2	1/2a	1/2b 1/2c	*	*
I/J	E1	1/2a	1/2a 1/2c	1/2a 1/2b	*
	E2	1/2a 1/2b	1/2a	1/2a	*
K	E1	1/2c	1/2a	*	1/2a
	E2	1/2a 1/2b	1/2b 4b	1/2b	*
L	E1	1/2a	1/2a 4b	ND	*
	E2	1/2a 1/2b 4e	1/2a 1/2b 4b	ND	*
M	E1	*	1/2a		
	E2	*	1/2c		
N	E1	1/2a 1/2c	1/2c	*	*

Sérotypes observés dans la viande crue et les saucissons à différents stades de fabrication.

ND: non réalisé. *: aucune *Listeria monocytogenes* détectée. E1/E2/E3: Échantillonnage 1, 2 et 3. Autoa: autoagglutination.

observée. Il est important de noter que la fabrication de mēlées est le résultat du hachage de viandes maigres et de gras suivi de l'ajout et du mēlange d'épices et de différents ingrédients. Il semble donc que cette hausse de la contamination soit le résultat de contaminations croisées résultant des manipulations multiples et mēlanges des matiēres premiēres et à la multiplication bactérienne.

Les résultats obtenus à partir des produits intermédiaires montrent une diminution des taux de contamination en *L. monocytogenes* en fin de phase d'étuvage (53,5 % contre 71,6 % dans la mēlée), mais surtout en fin de sēche (10 %) (tableau 2). Cette diminution est probablement due à la diminution du pH des produits, résultat de la fermentation des sucres par les bactéries lactiques en acide lactique. Mēme si la plupart des auteurs s'accordent pour dire que l'acide lactique est un fort inhibiteur, le pH atteint (environ 5,0) dans les produits ne représente pas un stress a priori suffisamment impor-

tant pour tuer le pathogène ou inhiber sa croissance.

Nous avons noté par ailleurs que le taux de contamination des produits en fin de sēche (J + 5) est très bas (10 %). Ce résultat suggère que la sērie de barriēres physico-chimiques et microbiologiques rencontrée par *L. monocytogenes*, diminution du pH dans un premier temps, puis diminution de l'Aw, a un impact sur la croissance et la survie de *L. monocytogenes*. La diminution de l'Aw observée entre la fin d'étuvage et la fin de la phase de maturation dessiccation semble être associée à une plus grande dysgénésie pour le pathogène.

Sérotypage

Au total, 996 souches ont été isolées et sérotypées avec les résultats suivants: 1/2a (49,5 %), 1/2c (19,5 %), 1/2b (13 %), 4b (8 %) et 4e (0,1 %) (tableau 3). La présence de souches de sérotype 4b dans les salaisons est d'une grande importance en termes de santé publique puisque ce sérotype est impliqué dans la majorité des épidémies de listériose liées à la

consommation de produits carnés.

De surcroît, nos résultats confirment que la majorité des souches isolées de la viande de porc crue appartient aux sérotypes 1/2a, 1/2b et 1/2c quant à eux associés à des cas de listérioses sporadiques.

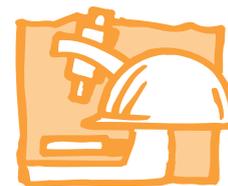
Des isolats de même sérotype, collectés sur une même surface après les opérations de nettoyage désinfection ont été retrouvés au cours des deux salves de prélèvements espacés de deux semaines. Le sérotypage n'est pas un marqueur épidémiologique pour considérer que ces isolats correspondent à une même souche. Il faudrait utiliser un autre outil beaucoup plus discriminant pour conclure à un éventuel lien de clonalité entre ces isolats (objet de l'étude ultérieure). Néanmoins, ces isolats de même sérotype ont été retrouvés sur les surfaces des entreprises de grande taille, ayant des machines complexes, suggérant une persistance, voire une résidence de ces isolats.

CONCLUSION

Les taux de contamination des produits intermédiaires par *L. monocytogenes* diminuent de manière significative au cours des différentes étapes de fabrication suggérant que les conditions dysgénésiques au pathogène sont de plus en plus marquées au fur et à mesure de la fabrication du saucisson sec. Pour démontrer de manière rigoureuse cette suppression, il faut recourir à des challenge-tests ou fabrications de produits avec une matière première volontairementensemencée avec des quantités connues de *L. monocytogenes*.

BIBLIOGRAPHIE

- FARBER J.M., PETERKIN P., 1991.** *Listeria monocytogenes*, A foodborne pathogen. Microbiol. Rev., 55, 476-511.
- FRYE D.M., ZWEIG R., STURGEON J., TORMEY M., LECAVALIER M., LEE I., LAWANI L., MASCOLA L., 2002.** An outbreak of febrile gastroenteritis associated with delicatessen meat contaminated with *Listeria monocytogenes*, Clin. Infect. Dis., 35, 943-949.
- GOULET C., ROCOURT J., REBIERE I., JACQUET C., MOYSE C., DEHAUMONT P., SALVAT G., VEIT P., 1998.** Listeriosis outbreak associated with the consumption of rillettes in France in 1983, J. Infect. Dis., 177, 155-160.
- NESBAKKEN T., KAPPERUD G., CAUGANT D.A., 1996.** Pathways of *Listeria monocytogenes* contamination in the meat processing industry. Int. J. Food Microbiol., 31, 161-171.



Science et
Technique

REMERCIEMENTS

Ce travail a été financé par l'Ofival (Office national interprofessionnel des viandes de l'élevage et de l'avi-culture), l'ANRT (Association nationale de la recherche technique), par la région Rhône-Alpes et la DRAF, l'Adiv (Association pour le développement de l'Institut de la viande) et 13 professionnels de la charcuterie salaison française. Nous remercions également l'Inra de Theix (laboratoire du Dr Talon) pour son support technique.