

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 les cas de listériose.

Le principal objectif de cette étude était d'étudier les liens de clonalité entre les 1 028 isolats de *Listeria monocytogenes* collectés de l'environnement de 13 entreprises de charcuterie salaison, des matières premières utilisées et des saucissons produits à différents stades de fabrication (Thevenot et al., 2005). Le sérotypage a été conduit afin d'apprécier très généralement le danger lié aux souches présentes dans les entreprises étudiées puisque seulement trois sérotypes sont associés à des cas de listériose. Par ailleurs, la macrorestriction enzymatique suivie d'une séparation des fragments d'ADN par électrophorèse en champs pulsé: pulstypage, a été utilisée pour caractériser les isolats de *L. monocytogenes*, et plus précisément pour évaluer la diversité des souches, déterminer l'existence possible de souches génétiquement proches entre les entreprises, d'identifier les sources du pathogène dans les entreprises et déterminer ses modalités de dissémination au sein de ces entreprises.

Listeria monocytogenes Caractérisation sérologique et moléculaire d'isolats de *Listeria* *monocytogenes* collectés dans 13 charcuteries salaisons et leurs produits

***L. monocytogenes* est souvent introduit dans les charcuteries salaisons par le biais de la matière première. Les produits intermédiaires peuvent être aussi l'objet de contaminations croisées impliquant la main d'œuvre et le matériel. Aussi les entreprises doivent être particulièrement vigilantes quant au respect de l'application stricte des procédures de nettoyage désinfection.**

THÉVENOT^a *D., DELIGNETTE-MULLER^a M.L., CHRISTIEANS^b S.,
LEROY^c S., KODJO^d A., VERNOZY-ROZAND^b C.

^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

^cInra, UR 454, Unité de microbiologie, Centre de Clermont-Ferrand-Theix. 63 122 SAINT-GENÈS CHAMPANELLE, France

^dUnité de microbiologie, Ecole nationale vétérinaire de Lyon BP 83, 69 280 MARCY L'ÉTOILE, France

Tableau 1 : LES SÉROTYPES OBSERVÉS SONT TRÈS VARIÉS

Sérotypes	Surfaces en contact avec la viande		Surfaces sans contact avec la viande		Mains	Viande crue	Saucissons	Total
	Avant travail	Pendant travail	Avant travail	Pendant travail				
	% de souches (total de 180)	% de souches (total de 467)	% de souches (total de 20)	% de souches (total de 43)				
1/2a	56,9	50,7	80	53,4	58,3	52,9	35,2	49,9
1/2b	8,9	13,5	20	11,6	0	7,7	17,9	12,7
1/2c	22,3	21,4	0	27,9	33,3	28,4	11	20,4
4b	5	7,2	0	6,9	0	5,2	16,3	8
4e	0,5	0	0	0	0	0	0	0,09
?	6,7	7	0	0	8,3	6	19,5	8,75

*Prévalence des différents sérotypes collectés dans les entreprises avant et pendant travail, dans la viande et les produits
? : Souches non sérotypées.*

Tableau 2 : LES PULSOTYPES OBSERVÉS SONT TRÈS HÉTÉROGÈNES

Salaisons		Surfaces avec contact avec la viande		Surfaces sans contact avec la viande		Mains	Viande hachée	Saucissons
		Avant travail	Pendant travail	Avant travail	Pendant travail			
A	E1	<u>1, 2, 28, 58</u> <u>2, 5, 15, 28</u>	<u>1, 60</u> <u>1, 5, 6, 14, 15,</u> <u>28, 40, 60, 63,</u> <u>67</u>	NS	NS	NS	<u>1</u>	<u>1, 28</u>
	E2	36, 52, 53, 56, 58, 60	NS	NS	NS	1, 6, 8, 53, 59, 62	<u>14, 22, 44,</u> <u>59, 60</u>	
	E3	<u>1, 7, 15, 28</u>	<u>1, 5, 7, 28</u>	NS	NS	NS	<u>7</u>	<u>1, 7, 28</u>
B	E1	NS	<u>1, 7, 8</u>	NS	NS	NS	NS	<u>7, 8</u>
	E2	<u>1</u>	<u>6, 7, 8, 41</u>	NS	NS	NS	1	6, 41
C	E1	<u>5, 16, 24</u>	<u>1, 2, 5, 24</u>	NS	NS	NS	<u>1, 2, 5</u>	<u>2, 5, 10</u>
	E2	<u>2, 5, 24</u>	<u>1, 3, 5, 9, 10,</u> <u>16, 24, 32, 57</u>	NS	NS	NS	<u>3, 5, 9</u>	<u>5, 32</u>
D	E1	NS	<u>1, 2, 5, 54</u>	NS	NS	NS	<u>1</u>	<u>1</u>
	E2	NS	<u>1, 2, 5, 8</u>	NS	NS	NS	38	<u>1</u>
E	E1	<u>5, 40, 69</u>	<u>5</u>	NS	NS	NS	25	<u>5, 25, 46</u>
	E2	NS	<u>5, 25</u>	NS	NS	NS	25	<u>5</u>
F	E1	<u>1, 3</u>	<u>1, 3, 6</u>	NS	NS	NS	<u>1, 3, 6</u>	<u>1, 3, 10,</u> <u>16, 79</u>
	E2	<u>1</u>	<u>1, 5</u>	NS	NS	NS	<u>1, 6</u>	NS
G	E1	NS	1, 4, 32	NS	NS	NS	32	22
H	E1	23, 29, 70	<u>1, 5, 12, 23,</u> <u>30, 37, 70, 73,</u> <u>80, 74</u>	NS	23	NS	23, <u>37</u> , 51, 72	<u>23, 27</u> , 71, 76
	E2	<u>12</u> , 18, 23, 29, 43	8, <u>12</u> , 23, 73, 75	<u>8</u> , 23	23	23	23, 29	<u>2</u> , 18
I/J	E1	NS	<u>1, 5, 34</u>	<u>5</u> , 34	<u>1</u>	NS	<u>4, 5</u>	<u>1, 5</u> , 34, 35, 68
	E2	NS	<u>1, 5, 7, 39</u>	<u>5</u>	<u>5</u>	<u>1, 5</u>	<u>5, 7</u>	<u>5</u>
K	E1	<u>5</u>	<u>1, 6, 27</u>	NS	<u>1, 6</u> , 45	<u>27</u>	<u>1</u>	<u>9, 27</u>
	E2	NS	8, 14, 21, 27, 42, 55	NS	9, 21, 83	NS	21, 66	21
L	E1	<u>11, 42</u>	65, 33, 17, 20	NS	65, 9, 8, 26, 20	NS	33, 17, 5	<u>11, 8</u> , 17, 14
	E2	50, 48	19, 26, <u>13</u> , 8, 42, <u>11</u> , 31	NS	<u>8</u>	NS	49, <u>26</u> , 64, <u>24</u> , <u>7</u> , 47, 19, 52	<u>11</u> , 19, 52, 64
M	E1	<u>1, 5</u>	<u>1, 5, 8, 27, 73</u>	NS	NS	NS	NS	<u>5, 27</u>
	E2	<u>1, 9, 78</u>	<u>1, 27</u>	NS	NS	<u>1</u>	NS	<u>1, 9</u> , 77
N	E1	NS	<u>1</u>	<u>1</u>	NS	NS	<u>1, 26, 27</u>	<u>1</u>

*Différents pulsotypes observés dans les 13 charcuteries salaisons.
NS: Aucune souche isolée. E1, E2, E3 : Échantillonnage 1, 2 et 3. Les pulsotypes soulignés ont été retrouvés dans plusieurs charcuteries salaisons*

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Après sérotypage, cinq différents sérotypes ont été détectés : 1/2a (49,9 %), 1/2c (20,4 %), 1/2b (12 %), 4b (8 %) et 4e (0,1 %) (tableau 1). Des distributions de sérotypes similaires ont été observées parmi des souches collectées dans des abattoirs et des ateliers de découpe de viande de porc.

Pendant l'activité, les résultats ont montré que toutes les surfaces étaient souillées par des souches appartenant aux mêmes sérotypes, et dans les mêmes proportions que celles isolées de la viande crue de porc, à savoir, les sérotypes 1/2a (52,9 %), 1/2c (28,4 %), 1/2b (7,7 %) et 4b (5,2 %). Les souches isolées des saucissons appartenaient aux mêmes sérotypes que les souches isolées de la viande crue, mais dans des proportions significativement différentes ($p < 0,0001$) : 1/2a (35,2 %), 1/2b (17,9 %), 4b (16,3 %), 1/2c (11 %). Les pourcentages de souches appartenant aux sérotypes 4b et 1/2b sont plus élevés, alors que ceux des souches de sérotypes 1/2a et 1/2c, le sont moins. La présence de souches de sérotypes 1/2a, 1/2b et 4b dans les saucissons est préoccupante pour le gestionnaire

du risque car la majorité des cas sporadiques de listériose est associée à ces sérotypes, et le sérotype 4b est lié à la plupart des épidémies récentes de listériose. Cependant, il est important de souligner que les taux de contamination des saucissons sont habituellement faibles (< 100 ufc/g) et a priori non suffisant pour être à l'origine de pathologie. Cette affirmation est toutefois à modérer car elle implique que *L. monocytogenes* présente dans le produit fini ne pourra jamais se développer. La démonstration devrait être faite par le fabricant.

Les résultats ont montré que quatre isolats d'une salaison avaient le même pulsotype que la souche de référence 4b. De plus, 45 isolats provenant d'un atelier étaient génétiquement proches (deux bandes de différence sur leur profil de macrorestriction) d'une souche impliquée dans un cas humain de listériose. Ainsi, la présence de telles souches dans l'environnement des ateliers, et par conséquent dans les produits pourrait représenter un danger si les germes parvenaient à se multiplier et à atteindre des taux supérieurs à 1 000 ufc/g.

Distribution globale des pulsotypes

Les 1 028 isolats collectés dans les salaisons et les quatre souches CIP ont été analysés par pulsotypage. À l'exception de cinq isolats résistants à l'enzyme ApaI, les isolats ont été groupés en 83 profils de macrorestriction (PFGE) (de T1 à T83). Quarante-deux pulsotypes incluaient des isolats de salaison, trois profils regroupaient, quant à eux des souches de salaison et des souches de collection (CIP) (figure 1).

La méthode d'analyse UPGMA a permis de grouper les pulsotypes dans deux groupes distincts. Le premier groupe incluait, en fonction de leurs antigènes flagellaires, les sérotypes 1/2a et 1/2c ; le second, les sérotypes 1/2b, 4b et 4e.

Distribution des pulsotypes au sein des entreprises

Les souches collectées au sein des entreprises ont montré une importante hétérogénéité génétique (grand nombre de pulsotypes) (tableau 2). Cette diversité est probablement le résultat de plusieurs facteurs : tout d'abord, la diversité des souches de la matière première crue associée à la grande diversité de souches collectées sur les surfaces et dans les produits intermédiaires. Cette diversité est d'autant plus importante que le tonnage travaillé par l'entreprise est lui-même important. Ceci peut s'expliquer par le fait que plus la quantité de viande utilisée est importante, plus la probabilité de contamination des équipements est élevée, résultat que nous avons retrouvé. La persistance de souches en dépit des opérations de nettoyage désinfection peut également contribuer à un niveau moindre toutefois, à la diversité génotypique des souches dans l'environnement des salaisons et des produits.

Dans cette étude, des souches ont été qualifiées comme persistantes dès lors que des isolats d'un même pulsotype ont été retrouvés dans l'environnement des ateliers à au moins 2 semaines d'intervalle.

Des contaminations persistantes ont été détectées dans quatre salaisons sur des matériels (couteaux) et des équipements. Cette persistance était probablement due à deux facteurs interagissant. Premièrement, les opérations de nettoyage désinfection n'étaient peut-être pas suffisamment effi-

MATÉRIEL ET MÉTHODE

Les souches étudiées ont été collectées précédemment dans 13 salaisons selon des plans de prélèvements spécifiques à chacune d'elle. Afin d'évaluer la persistance des souches au sein des entreprises, deux salves de prélèvements ont été répétées, avec au moins 2 semaines d'intervalle (Thévenot et al., 2006). Les prélèvements ont été effectués sur les surfaces (avec contact ou non avec la matière première) avant et pendant l'activité, dans les matières premières et les saucissons à différents stades de maturation (après embossage, en fin de sèche, fin d'étuvage et à DLUO). Au total, 1 028 souches (996 de l'étude précédente et 32 collectées selon le même protocole) ont été étudiées.

Quatre souches supplémentaires de *L. monocytogenes* ont été incluses dans l'étude : deux souches de référence des sérotypes 4b (CIP (Collection de l'Institut Pasteur) 78.38) et 1/2a (CIP 104794) ; et deux autres souches impliquées dans des cas de listériose humaine (CIP 105550 de sérotype 4b et CIP 100607 de sérotype 1/2a).

Sérotypage

Le sérotypage a été réalisé en utilisant des sérums anti *Listeria* selon les recommandations du fabricant (Thévenot et al., 2006).

Analyse des souches par macrorestriction

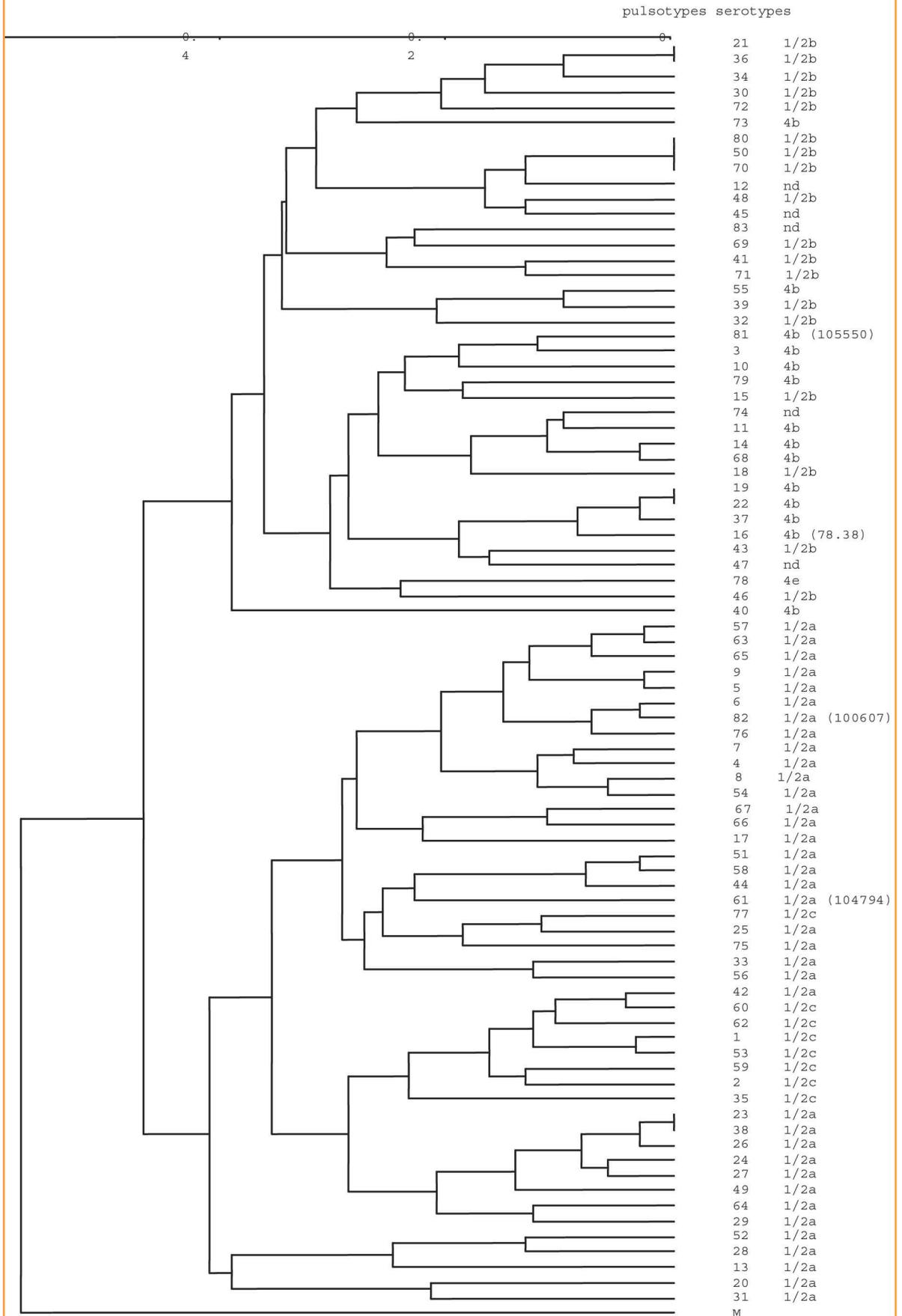
Après extraction de l'ADN total bactérien, ce dernier a été digéré par l'enzyme à sites de coupures rares ApaI. Les fragments obtenus ont été séparés par électrophorèse de l'ADN en champ pulsé (Pulsed Field Gel Electrophoresis). Les profils d'ADN obtenus ont été visualisés sous lumière U.V., et les images capturées par un système vidéo.

L'estimation de la taille des fragments et la comparaison des profils des différents isolats a été réalisée en utilisant le logiciel Taxotron. Les similarités entre profils ont été établies en employant un coefficient de Dice de 1,2 %. Les différents profils ont été regroupés en utilisant la méthode d'analyse UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Analysis) avec une erreur allant de 3,5 à 5 %.

Analyse statistique

La distribution des sérotypes a été comparée en utilisant le test de Chi2, et la diversité des pulsotypes a été comparée grâce au test de Wilcoxon. Les calculs statistiques ont été réalisés en utilisant le logiciel Software R (version 1.6.1).

Figure 1
RELATIONS GÉNIQUES OBSERVÉES ENTRE LES 83 PULSOTYPES DE L'ÉTUDE



nd : Non déterminé; nb de souches (x) : souches CIP (issues de la collection Pasteur)

caces. En effet, les produits désinfectants doivent impérativement atteindre les sites de contamination à des concentrations données et ce, pendant des durées suffisantes pour être efficaces. Ceci n'est pas toujours le cas lorsque les opérations de nettoyage désinfection sont menées sur des chaînes de fabrications trop complexes et de machines non démontables et présentant de nombreuses zones non atteintes par les produits. En effet, les espaces réduits, les ouvertures étroites, les angles droits, les coutures difficiles, voire impossibles à atteindre, entraînent un nettoyage mécanique insuffisant et de fait, une désinfection peu ou pas efficace. Ce travail confirme les résultats exposés dans notre précédente publication (Thévenot et al., 2006): les entreprises travaillant de gros tonnages de viande sont plus concernées par les souches persistantes que les plus petites. Le second facteur pourrait être la nature elle-même des souches qui seraient particulièrement adaptées à l'environnement des salaisons et à la viande de porc. Plus précisément, parmi les 80 pulsotypes des souches de salaisons, 21 étaient collectés dans différentes salaisons et 59

étaient collectés dans une seule entreprise. Notre étude a également montré que des isolats provenant de plusieurs salaisons utilisant des matières premières d'origines différentes partageaient le même pulsotype. On suppose donc que certaines souches peuvent avoir une distribution plus large que d'autres, et par conséquent peuvent être introduites et réintroduites continuellement dans les entreprises par le biais notamment de la viande crue. Les souches résidentes d'ateliers n'ont peut-être pas forcément de supériorité écologique, elles bénéficient peut-être simplement de procédures de nettoyage désinfection inadaptées. Par contre, les clones circulants présents dans différentes entreprises géographiquement éloignées suggèrent leur grande ubiquité permise par une adaptation de souches à des conditions et des matrices extrêmement variées.

CONCLUSION

Cette étude a révélé le fait que des souches de *L. monocytogenes* sont introduites dans les ateliers de charcuteries salaisons par le biais de la matière première.

La contamination des produits intermédiaires peut également être le résultat de contaminations croisées impliquant le matériel et la main d'œuvre. Dans le but de réduire la présence de souches persistantes au sein des ateliers, une attention plus particulière devrait être portée aux procédures de nettoyage désinfection. Ces dernières doivent être appropriées avec en particulier la rotation de désinfectants qui ralentirait l'adaptation des cellules aux produits. Notons par ailleurs la nécessaire adéquation entre la conception des machines et des lignes de fabrication avec leur aptitude au nettoyage et à la désinfection. Enfin, la mise en place de guides de bonnes pratiques d'hygiène de fabrication est un minimum en dessous duquel il ne faudrait pas aller. L'idéal serait la mise en place d'une méthode de maîtrise des risques de type HACCP, méthode prévue par la réglementation depuis la directive CEE hygiène de 1993, mais qui est loin d'être comprise et/ou appliquée de manière pertinente par toutes les entreprises, même celles traitant de gros tonnages de viande.



Science et
Technique

REMERCIEMENTS

Ce travail a été financé par l'Ofival (Office national interprofessionnel des viandes de l'élevage et de l'aviculture), 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.

B I B L I O G R A P H I E

FARBER J.M., PETERKIN P., 1991. *Listeria monocytogenes*, a foodborne pathogen. *Microbiol. Rev.*, 55, 476-511.

FRYE D.M., ZWIG 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.

THÉVENOT D., DELIGNETTE-MULLER M.L., CHRISTIEANS S., VERNZOY-ROZAND C., 2005. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in 13 dried sausage processing plants and their products. *Int. J. Food Microbiol.*, 102, 85-94.

THÉVENOT D., DELIGNETTE-MULLER M.L., CHRISTIEANS S., VERNZOY-ROZAND C., 2005. Prévalence de *Listeria monocytogenes* dans treize charcuteries salaisons et leurs produits. *Viandes et Produits Carnés*, 25 (6), 224-228.