



Origine des *Listeria monocytogenes* et de *Salmonella* présentes sur les produits de découpe de porc. Apport des outils innovants de typage moléculaire pour le suivi des contaminations en abattage et découpe de porc. Partie I : *Listeria monocytogenes*

Inès GIOVANNACCI (1), Jean-Luc VENDEUVRE (1), Gwennola ERMEL (2), Gilles SALVAT (2), Vincent CARLIER(3)

(1) CTSCCV, 7 avenue du Général de Gaulle, 94700 Maisons-Alfort, giovannaeci@vet-alfort.fr

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

(3) ENVA, 7 avenue du Général de Gaulle, 94700 Maisons-Alfort.

RESUME

Le typage moléculaire représente aujourd'hui un outil très performant pour améliorer les connaissances concernant les sources et voies de transmission des bactéries pathogènes dans les systèmes de production agro-alimentaires.

L'application du pulsotypage (cf. *Bulletin de Liaison du CTSCCV 2000, vol. 10, n° 1*) à une collection d'isolats de *Listeria monocytogenes* provenant de cinq entreprises d'abattage et de découpe de porc a permis de tirer plusieurs conclusions quant aux voies de transmission de cette bactérie dans la filière porcine. Aucun pulsotype dans cette collection n'était similaire à ceux de souches épidémiques connues. Un clone prédominant de *Listeria monocytogenes*, principalement associé au sérotype 1/2a, est apparu très répandu, depuis la stabulation des porcs jusqu'aux pièces de découpe, dans plusieurs entreprises géographiquement éloignées. Ce résultat montre qu'il n'existe pas de réservoir lié à une région géographique donnée. Par ailleurs, l'identité constatée entre des pulsotypes isolés de l'environnement des entreprises et des produits de porc a confirmé l'impact de la contamination environnementale sur la contamination des produits de découpe de porc par *Listeria monocytogenes*. Enfin, le pulsotypage a permis de montrer une contamination endémique de certaines entreprises, avec une persistance d'une année sur l'autre de certains clones de *Listeria monocytogenes* dans des " niches " environnementales favorables à leur survie.

INTRODUCTION

La sécurité alimentaire est devenue un enjeu majeur pour les pouvoirs publics comme pour les fabricants de produits destinés à la consommation humaine. Cette sécurité passe, en particulier, par la maîtrise de la contamination des produits alimentaires par les bactéries pathogènes.

Parmi celles-ci, *Listeria monocytogenes* et *Salmonella* font l'objet de préoccupations dans de nombreux secteurs de l'agro-alimentaire. Les professionnels de la transformation des viandes ont désormais une obligation de performance hygiénique, afin de garantir la sécurité du consommateur. Ils doivent apporter la preuve scientifique de la sécurité offerte par

leurs produits afin de satisfaire les exigences croissantes des distributeurs et importateurs. Les professionnels de la transformation de la viande de porc ont réagi, depuis quelques années pour répondre à cet impératif de sécurité. Epaulés par leurs organisations professionnelles et leur Centre Technique, ils ont élaboré et mis en œuvre 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 primordiaux de maîtrise de la qualité des produits finis. Ainsi, le Centre Technique de la Salaison, de la Charcuterie et des Conserves de Viandes (CTSCCV) a initié un programme de recherche, qui a fait l'objet d'un travail de thèse, intitulé " Origine des *Listeria monocytogenes* et *Salmonella* présentes sur les produits de découpe de porc " (disponible au CTSCCV). Ce travail a été mené en collaboration avec l'Unité Hygiène et Qualité des Produits Avicoles et Porcins (HQPAP) de l'AFSSA Ploufragan.

Les techniques de typage moléculaire (cf. *Bulletin de Liaison du CTSCCV 2000, vol. 10, n° 1*), sont devenues incontournables pour l'étude fine des sources et voies de transmission des bactéries pathogènes dans les systèmes de production. Ainsi, nous avons appliqué ces techniques à des collections de *Listeria monocytogenes* et de *Salmonella* constituées à partir d'enquêtes réalisées dans plusieurs entreprises d'abattage et découpe de porc. Cet article traite du volet de l'étude relatif à *Listeria monocytogenes*. Dans un prochain article à paraître dans le Bulletin de Liaison (Épidémiologie de *Listeria monocytogenes* et de *Salmonella* en abattage et découpe de porc - Apport des outils innovants de typage moléculaire. Partie II : *Salmonella*) nous présenterons les résultats relatifs à *Salmonella* en abattage et découpe de porc.

MATERIEL ET METHODES

Collection de *Listeria monocytogenes*

La collection de *Listeria monocytogenes*, qui a servi de support à cette étude, a été constituée à l'origine par l'Institut Technique du Porc (ITP), dans le cadre d'enquêtes de terrain menées durant l'automne 1995, dans 5 entreprises d'abattage et découpe de porc. Les enquêtes ont été réalisées dans trois entreprises possédant les activités d'abattage et de découpe (E1, E2 et E5) alors que E3 était un abattoir et E4 un atelier de découpe.

Les prélèvements en abattoirs ont concerné des lots de porcs (animaux vivants, carcasses en fin de chaîne d'abattage et à la sortie du premier ressuyage) ainsi que l'environnement des abattoirs et des salles de ressuyage après le nettoyage et la désinfection ainsi que durant les activités. Dans les ateliers de découpe, les prélèvements ont été réalisés sur les carcasses avant découpe et sur les pièces de découpe primaire et secondaire issues des carcasses précédentes, à l'entrée en salle de stockage. Des prélèvements ont également été effectués dans l'environnement des ateliers de découpe après nettoyage et désinfection et pendant les activités.

Les résultats détaillés issus de ces enquêtes ont été publiés par l'Institut Technique du Porc (Corrégé, 1997). Les tableaux 1 et 2 résument les taux de présence de *Listeria monocytogenes* sur les produits et dans l'environnement toutes entreprises confondues.

Afin d'étudier l'évolution de la contamination environnementale par *Listeria monocytogenes* au cours du temps, des prélèvements ont été renouvelés, en décembre 1996, dans l'environnement des entreprises E3 et E5, après les opérations de nettoyage et désinfection.

Porcs vivants	27,5 %
Carcasses en fin d'abattage	32 % (0-89 %)*
Carcasses en fin de premier ressuyage	70 % (20-96%)*
Pièces de découpe	59 % (33-87%)*

Tableau 1 : Pourcentage de prélèvements, effectués sur des lots de porc, positifs en *Listeria monocytogenes* (Corrégé, 1997).

* Les nombres figurant entre parenthèses indiquent les pourcentages minimal et maximal de prélèvements positifs en *Listeria monocytogenes* rencontrés dans les différentes entreprises.

Sites	Après nettoyage et désinfection	Pendant l'activité (Après 6h d'activité)
Abattoir	10 % (0-30 %)*	40 % (20-60%)*
Ressuyage	30 %	57,1 %
Découpe primaire	29,4 %	63,5 %
Découpe secondaire	14,3 %	87,1 %
Salles d'expédition	40,0%	25,0 %
Salle de réfrigération	21,4 %	37,5 %

Tableau 2 : Pourcentages de prélèvements, effectués dans des abattoirs et ateliers de découpe de porc, positifs en *Listeria monocytogenes* (Corrégé, 1997).

* Les nombres figurant entre parenthèses indiquent les pourcentages minimal et maximal de prélèvements positifs en *Listeria monocytogenes* rencontrés dans les différentes entreprises.

Méthodes de caractérisation de *Listeria monocytogenes*

Tous les isolats de *Listeria monocytogenes* recueillis par l'Institut Technique du Porc n'ont pu être conservés. Au total, 287 isolats ont pu être caractérisés principalement par les techniques de sérotypage (typage phénotypique classique) et de pulsotypage avec *Apal* (typage moléculaire). Ces techniques ont été présentées lors d'un précédent article dans le *Bulletin de Liaison du CTSCCV 2000, vol.10, n°1*).

RESULTATS - DISCUSSION

Diversité des *Listeria monocytogenes* provenant d'entreprises d'abattage et découpe de porc

Le pulsotypage de 287 isolats de *Listeria monocytogenes* a permis de distinguer 17 " codes-barres " (pulsotypes) différents, notés a1 à a17. La figure 1 présente les 17 pulsotypes ainsi que les sérotypes associés à chacun d'entre eux.

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

Parmi les pulsotypes obtenus dans la collection, aucun ne présentait de similitude avec ceux des souches à l'origine des épidémies de 1992 et 1993.

Nous avons pu observer une certaine diversité génétique parmi les *Listeria monocytogenes* provenant de 5 entreprises d'abattage et de découpe de porc puisque 4 groupes génomiques bien distincts, A, B, C et D, ont été mis en évidence. Toutefois, malgré la variabilité des types identifiés, le groupe A, représenté par un grand nombre de pulsotypes très proches, était largement prédominant et représentait à

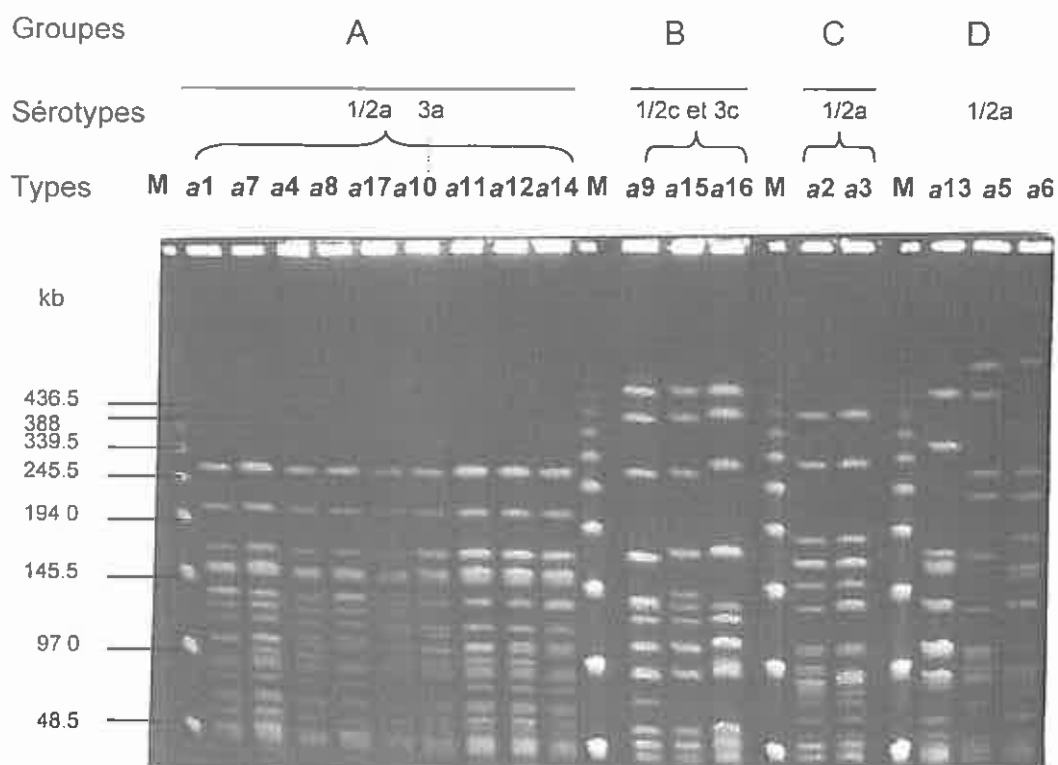


Figure 1

Profils représentant les 17 pulsotypes (codes-barres) obtenus par macrorestriction de l'ADN avec l'enzyme *ApaI* appliquée à 287 isolats de *Listeria monocytogenes* collectés en entreprises d'abattage et découpe de porc et sérotypes associés.

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

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

lui seul près de 90 % des isolats typés. Des pulsotypes (*Apaf*), très voisins de ceux des pulsotypes du groupe A, ont été mis en évidence au cours d'autres travaux français notamment par :

- Kerouanton *et al.* (1998) à partir de prélèvements réalisés dans une usine de fabrication de produits de charcuterie, au niveau de tables de désossage de pièces de porc ainsi que dans les salles frigorifiques de l'usine,

- Radas *et al.* (1999) en abattage et découpe de volaille.

Ces données renforcent l'idée qu'un clone de *Listeria monocytogenes*, présentant un génotype identique ou proche de ceux rassemblés dans le groupe A, est largement répandu dans les filières agro-alimentaires et, plus particulièrement, dans les filières liées à la viande.

Traçabilité de *Listeria monocytogenes* dans les 5 entreprises d'abattage et découpe de porc

La distribution des pulsotypes de *Listeria monocytogenes*, notés a1 à a17, en fonction des entreprises et des points de prélèvements est donnée dans le tableau 3.

E1- La contamination de cette entreprise était caractérisée par l'omniprésence du pulsotype a1. Il a été l'unique pulsotype mis en évidence à la fois dans les locaux de l'abattoir et sur les carcasses jusqu'à la fin du ressuyage. Près de deux mois après l'enquête en abattoir, le pulsotype a1 a été isolé aussi bien des pièces de découpe que de l'environnement de l'atelier de E1. Ce type était associé à un autre pulsotype très proche (a4), retrouvé sur des poitrines manipulées sur les mêmes lignes à deux stades d'élaboration distincts : brutes et découennées-désossées.

E2 - Dans l'entreprise E2, il est apparu une plus grande variabilité des pulsotypes de *Listeria monocytogenes*. Le pulsotype a1, présent sur porcs vivants, dans l'environnement et sur carcasses était associé à d'autres pulsotypes plus divers. En effet, dans l'abattoir en cours d'activité, les pulsotypes a9 et a16, associés au groupe B et au sérogroupe c, ont été retrouvés sur des tapis à déchets et balancelles à abats. Les carcasses en sortie de ressuyage étaient également contaminées, outre le pulsotype a1, par un pulsotype très proche, le a14 et par le a13, pulsotype d'exception dans la collection, puisque mis en évidence nulle part ailleurs. Dans l'atelier de découpe, enquêté trois semaines après l'abattoir, les isolats collectés sur carcasses entrantes et dans les locaux après nettoyage et désinfection n'ont pu être conservés. Toutefois, les pulsotypes a9 et a16, d'une part, retrouvés au préalable dans l'abattoir et a17, d'autre part, proche du pulsotype a1, ont été mis évidence aussi bien sur pièces de découpe que dans l'environnement. Cette identité de pulsotypes a mis ainsi en relief des phénomènes de contaminations croisées entre les surfaces et les produits. Ceci impliquait donc que l'origine des contaminations se trouvait soit au niveau de l'entrée en découpe des carcasses contaminées et/ou au niveau de l'environnement de l'atelier de découpe.

E3 - La contamination de l'abattoir E3 était caractérisée exclusivement par des types de *Listeria monocytogenes* très proches du pulsotype a1. Une identité de types de *Listeria monocytogenes* a pu être constatée entre 1995 et 1996, au sein des locaux de ressuyage, après les opérations de nettoyage et de désinfection. En particulier, l'isolement les pulsotypes a4, a7 et a11, provenant de ventilateurs, très rarement nettoyés, pouvait impliquer une persistance durable de ces génotypes dans l'environnement de l'entreprise.

Origine des *Listeria monocytogenes* et de *Salmonella*

	E1 1995	E2 1995	E3 1995	E3 1996	E4 1995	E5 1995	E5 1996
ABATTOIR							
Environnement	J	J	J	J	NR	J + 21	J
- Avant activité	a1			a7	NR	a1	
- En cours d'activité	a1	a1, a9, a16	a10		NR	a1, a5	
Porc							
- Porcs vivants	a1, a2	a1	NC		NR	a6	
- Carcasses fin de chaîne	a1	a1	a10, a12		NR		
RESSUYAGE							
Environnement	J	J	J+60	J	NR	J + 21	J
- Après nettoyage et désinfection			a4, a10, a11	a4, a7, a10, a11, a12	NR	a1	a1, a8
- En cours d'activité	a1		a4, a8, a10		NR	a1	
Porc							
- Carcasses fin de ressuyage	a1	a1, a13, a14	NC		NR	a1, a6	
DECOUPE							
Environnement	J+50	J+21			J	J	J
- Après nettoyage et désinfection	-	NC	NR	NR	NC	a1, a4, a7, a2	a4, a7
- En cours d'activité	a1, a3	a4, a17, a9, a15, a16	NR	NR	NC	a1, a4, a7	
Porc							
- Carcasses avant découpe		NC	NR	NR	NC	a1, a3	
- Pièces de découpe primaire	a1, a4	a9	NR	NR	a1	a1, a8	
- Pièces de découpe secondaire	a1, a4	a8, a17, a9, a16	NR	NR	a1, a9	a1, a2	

Tableau 3 : répartition des pulsotypes (a1 à a17) de *Listeria monocytogenes* en fonction des entreprises et des points de prélèvement.

J et J + X indique pour une même année, pour chaque entreprise, que les prélèvements ont eu lieu le jour J puis X jours plus tard (lecture par colonne).
 NR : Non réalisé
 NC : Présence de *Listeria monocytogenes* mais isolats non conservés.

E5 - La contamination de l'entreprise E5 est apparue, elle aussi, très abondamment marquée par le pulsotype a1, isolé des locaux de l'abattoir après nettoyage et désinfection lors des deux séries de prélèvement conduites en 1995 et en 1996. Les pièces de découpe étaient contaminées par des souches appartenant aux types a1 et a2, mis en évidence dans l'environnement de l'atelier avant démarrage des activités le matin. Ceci montre encore les phénomènes de contamination croisée entre l'environnement et les produits. Une année plus tard, les locaux de découpe après nettoyage et désinfection montraient une contamination par *Listeria monocytogenes* appartenant aux pulsotypes a4 et a7, proches du pulsotype a1, et déjà isolés une année auparavant. Là encore, la localisation de ces pulsotypes, entre autres au niveau de zones peu accessibles aux opérations de nettoyage et désinfection courantes, c'est à dire les plafonds et murs, impliquaient une possible persistance de ces souches dans des niches adaptées à leur maintien.

E4 - Dans le cas de l'entreprise E4, un très faible nombre d'isolats, provenant uniquement des pièces de découpe, a pu être conservé. Toutefois, le cas de cette entreprise était intéressant. En effet, cette entreprise était géographiquement très éloignée des autres et le pulsotype a1, très répandu par ailleurs, ainsi que le type a9, mis en évidence dans l'entreprise E2, ont pu y être isolés. Ce constat montre l'improbabilité de l'existence de réservoirs de *Listeria monocytogenes* spécifiques d'une région géographique donnée et tendrait à montrer l'existence d'une adaptation de souches de *Listeria monocytogenes* liées à une activité, en l'occurrence, ici, l'abattage et la découpe de porc.

*Si de nombreuses études ont pu identifier la présence de *Listeria monocytogenes* en abattage et découpe de porc, aucune n'avait jusqu'alors mis en évidence l'existence de contamination endémique.*

En effet, les pulsotypes du groupe A ont pu être mis en évidence, y compris après les opérations de nettoyage et désinfection, à une année d'intervalle dans les locaux des entreprises E3 et E5. Ceci peut être lié à :

- la capacité de certaines souches de *Listeria monocytogenes*, notamment celles appartenant au groupe A, à s'implanter et à persister dans les entreprises,

- à l'entrée de porcs contaminés, constituant une source régulière d'apport de souches de *Listeria monocytogenes*.

Parmi les deux hypothèses, la première est plus vraisemblable. En effet, ce travail a pu montrer que les porcs vivants peuvent véhiculer des souches de *Listeria monocytogenes*, notamment celles du groupe A (type a1). Toutefois, les types du groupe A ont pu être isolés de zones en contact direct avec les produits mais aussi de zones très éloignées des produits et rarement soumises à des procédures hygiéniques efficaces (rails, ventilateurs, murs au dessus de 2 mètres de hauteur, plafonds, évaporateurs), ce qui tendrait à prouver une implantation durable dans l'environnement des entreprises.

CONCLUSIONS

Le pulsotypage, appliqué à une collection de *Listeria monocytogenes* provenant d'abattoirs et d'ateliers de découpe de porc, a permis de constater des identités entre les souches isolées de produits de porc (carcasses et produits de découpe) et de l'environnement de plusieurs entreprises. Ainsi, le pulsotypage a permis de renforcer l'hypothèse de l'existence de contaminations croisées entre les surfaces environnementales et les produits de porc.

Le pulsotypage a, en outre, permis de constater que des *Listeria monocytogenes*, correspondant aux pulsotypes très proches regroupés dans le groupe A, étaient largement disséminés en abattage et découpe de porc. Cette lignée clonale de *Listeria monocytogenes* semble ainsi présenter une grande capacité d'adaptation aux conditions de la filière porcine.

L'identification de certains pulsotypes de *Listeria monocytogenes* persistant au niveau de zones peu accessibles aux procédures hygiéniques montre que, plus que l'abattage d'animaux contaminés, c'est l'absence ou l'inefficacité des opérations de nettoyage et de désinfection dans certaines zones qui favorise l'implantation des *Listeria monocytogenes* à l'origine de la contamination des produits de découpe de porc.

Les auteurs remercient l'ITP pour la mise à disposition de la collection de *Listeria monocytogenes*. Ce travail a bénéficié de financements de l'ACTIA, de l'ANRT et de l'OFIVAL.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

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.

Jacquet, B. et Peyraud, D. 1995 La maîtrise de la qualité microbiologique des produits transformés à base de viandes. Viandes et Produits Carnés 16 (6) : 203-206.

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.

