



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 II : *Salmonella*

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

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

(2) AFSSA Ploufragan, UR HQPAP, BP 53, 22440 Ploufragan,

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

RESUME

L'objectif de ce travail était de déterminer l'origine des *Salmonella* présentes sur les produits de découpe de porcs.

Pour cela, plus de 300 prélèvements ont été réalisés dans 2 entreprises d'abattage et découpe de porc, des porcs vivants aux pièces de découpe. *Salmonella* a pu être isolée à tous les stades de l'abattage et de la découpe, aussi bien du porc (animaux, carcasses, pièces de découpe) que de l'environnement des entreprises, y compris après les opérations de nettoyage et désinfection dans les abattoirs. Jusqu'à 9 isolats par prélèvement positif ont été conservés afin d'être plus finement caractérisés par sérotypage et pulsotypage.

Le sérotypage a permis d'identifier 8 sérotypes parmi les 853 isolats récoltés, Typhimurium (ST) et Derby (SD) étant prédominants dans les deux entreprises. L'application du pulsotypage aux isolats de ST et de SD a permis de distinguer 20 et 16 types respectivement. Il est apparu des souches de ST et de SD communes aux 2 entreprises dont les plus répandues avaient une origine animale.

Le pulsotypage a mis en évidence des contaminations croisées entre le porc et l'environnement des entreprises. Toutefois, contrairement à la contamination des entreprises d'abattage et découpe de porc par des *Listeria monocytogenes* résidentes, les souches de *Salmonella* ne semblent pas s'implanter. Le pulsotypage de ST et de SD a montré que ce sont les carcasses contaminées du fait du portage asymptomatique (portage sain de *Salmonella* par les porcs, sans manifestation clinique) et de la dissémination des *Salmonella* par les pratiques d'abattage qui sont, soit directement, soit par le biais de contaminations croisées avec les surfaces de travail, à l'origine de la contamination des produits de découpe de porc.

INTRODUCTION

L'objectif de ce travail était d'identifier les sources de contamination par *Salmonella* des produits de découpe de porc, matières pre-

mières carnées des produits de charcuterie et des salaisons.

Lors d'une première phase, des souches de *Salmonella* ont été collectées dans 2 entreprises industrielles d'abattage et de découpe de

porc. Les prélèvements étaient répartis des cases de stabulation jusqu'aux pièces de découpe.

Dans un second temps, des outils innovants de typage bactérien issus de la biologie moléculaire (essentiellement le pulsotypage) ont été appliqués à la collection de *Salmonella* afin d'obtenir des informations relatives à :

- la diversité des *Salmonella* rencontrées dans ce domaine d'activité,
- la cartographie et la traçabilité des contaminations par *Salmonella* au sein des entreprises,
- l'évolution des contaminations en terme qualitatif, c'est-à-dire répondre à la question suivante : retrouve-t-on toujours ou non les mêmes souches ?

I. CONSTITUTION D'UNE COLLECTION DE *SALMONELLA* EN ENTREPRISES D'ABATTAGE ET DE DECOUPE DE PORCS

1. Campagnes de prélèvements en abattoirs et ateliers de découpe

- Entreprises et plan de prélèvement

314 prélèvements ont été réalisés lors de 7 campagnes, réparties sur une année (**tableau I**) dans 2 entreprises d'abattage et de découpe de porcs désignées par les codes S1 et S2.

Il s'agissait d'entreprises à gros volumes d'activité, avec des cadences d'abattage de 600 à 800 porcs / heure.

Lors de chaque campagne, les prélèvements ont consisté à suivre une bande de porcs (80 à 150 animaux) provenant d'un élevage donné, de la stabulation au stade pièces de découpe.

A l'abattoir, les prélèvements ont été réalisés sur les porcs vivants dans les cases de stabulation et sur les carcasses à différents stades d'élaboration (après saignée, échaudage, épilage, détournage de la rosette, éviscération, fente, ressuyage...). Parallèlement, des ganglions mésentériques ont été prélevés sur 5 ventrées par lot de porcs afin d'avoir une idée du portage asymptomatique du lot de porcs considéré.

Dans la zone de découpe, les prélèvements ont été réalisés sur carcasses avant découpe et sur les pièces de découpe suivantes : jambon brut et 2 pièces de découpe secondaire (épaule et poitrine).

Des prélèvements ont également été réalisés dans l'environnement de production, juste avant passage du lot de porcs suivi, à la fois dans la zone d'abattage ainsi que dans la zone de découpe (matériels, outils, sols...). Au cours de campagnes de prélèvements indépendantes, des prélèvements environnementaux ont été réalisés avant reprise des activités le matin.

- Réalisation des prélèvements

Les prélèvements environnementaux, sur porcs et sur carcasses ont été réalisés par chiffonnage. Les pièces de découpe ont fait l'objet d'un double prélèvement par excision et par chiffonnage.

Entreprises	En cours d'activité		Avant reprise des activités	
	n° campagne	date	n° campagne	date
S1	1	14 avril 1997	2	29 avril 1997
	3	21 mai 1997	4	4 novembre 1997
S2	5	10 décembre 1997	6	16 décembre 1997
	7	13 janvier 1998		

Tableau I : Calendrier des 7 campagnes de prélèvements effectuées en vue de la recherche de *Salmonella* dans les entreprises S1 et S2.

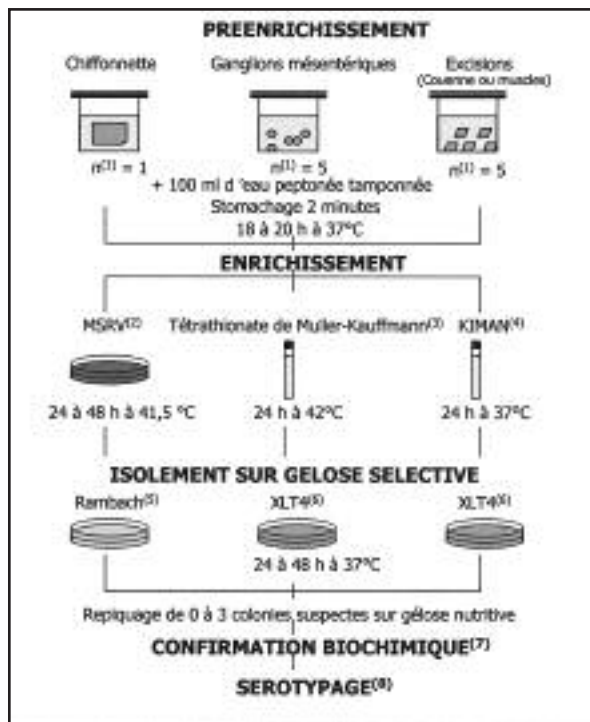


Figure 1 : Principe de la technique analytique utilisée pour la recherche de *Salmonella*.

- Méthode analytique pour la recherche de *Salmonella*

Les échantillons (chiffonnets et pièces de viande) ont été traités selon la méthode de routine V08-052 légèrement modifiée, tel qu'indiqué sur la **figure 1**.

Trois colonies suspectes de *Salmonella* par boîte d'isolement sélectif ont fait l'objet d'une confirmation biochimique. Ainsi, jusqu'à 9 isolats de *Salmonella* par prélèvement positif ont été conservés.

2. Résultats de présence de *Salmonella*

En cours d'activité, dans les abattoirs, jusqu'au ressuyage, les niveaux de contamination par *Salmonella* étaient élevés dans les deux entreprises (**tableau II**).

Les porcs abattus dans S1 ou S2 ont montré la présence de *Salmonella* dans les ganglions

(¹) n : Nombre d'unités d'échantillon pour la réalisation de l'analyse. (²) : Modified Semi-Solid Rappaport-Vassiliadis (Oxoid). (³) : Tétrathionate de Muller-Kauffmann (AES Laboratoire) supplémenté de Vert Brillant à 0,1 % (Merck) et de novobiocine (AES). (⁴) : Milieu de base Whitley Impedance Broth (Shipley, UK) supplémenté de novobiocine, vert malachite et iodure de potassium. (⁵) : Rambach (Merck). (⁶) : XLT4 (Difco). (⁷) : Selon la norme V08-052. (⁸) : Selon le schéma de Kauffmann-White.

mésentériques, témoignant d'un portage sain de la bactérie.

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 élevés.

Avant reprise des activités, les abattoirs ont montré des sites positifs au niveau de zones restées visiblement souillées par de la matière organique (épaveuses, polisseuses...). Dans les salles de ressuyage, les prélèvements positifs provenaient de sang au sol ou de souillures sur les parois.

En découpe, où les équipements (tapis et outils) étaient visiblement propres avant reprise des activités, aucune *Salmonella* n'a été retrouvée le matin.

Origine des *Listeria monocytogenes* et de *Salmonella*

	S1	S2
ABATTOIR		
Environnement après nettoyage et désinfection	8 / 22	8 / 11
Environnement en cours d'activité	19 / 22	16 / 20
Porcs vivants	3 / 4	3 / 4
Ganglions mésentériques	1 / 2	2 / 2
Carcasses (de la saignée à l'inspection vétérinaire)	12 / 14	14 / 16
RESSUYAGE		
Environnement avant reprise des activités	2 / 4	1 / 2
Environnement en cours d'activité	1 / 4	3 / 4
Carcasses après le premier ressuyage	3 / 4	4 / 4
LOCAUX AVANT DECOUPE		
Environnement avant reprise des activités	1 / 4	1 / 2
Environnement en cours d'activité *	2 / 8	1 / 4
Carcasses avant découpe	2 / 4	4 / 4
LOCAUX DE DECOUPE		
Environnement après nettoyage et désinfection	0 / 20	0 / 12
Environnement en cours d'activité	9 / 20	15 / 21
Carcasses après affalage	1 / 4	NR
Jambons bruts - Total	1 / 6	5 / 6
Jambons bruts - <i>Chiffonnage</i>	1 / 2	1 / 2
Jambons bruts - <i>Excision</i>	0 / 4	4 / 4
Poitrines DD - Total	0 / 6	3 / 6
Poitrines DD <i>Chiffonnage</i>	0 / 2	2 / 2
Poitrines DD <i>Excision</i>	0 / 4	1 / 4
Epaules DD - Total	0 / 6	4 / 6
Epaules DD - <i>Chiffonnage</i>	0 / 2	2 / 2
Epaules DD - <i>Excision</i>	0 / 4	2 / 4

Tableau II : Résultats de recherche de *Salmonella* dans les entreprises S1 et S2.

* Dans le cas de S1, l'environnement avant découpe comprend non seulement les locaux de stockage des carcasses mais aussi les parois de camions ainsi que le personnel affecté au transport des carcasses.

Sérotypes	Total			
	S1	S2	n	%
Typhimurium	270	120	390	45,7
Derby	128	157	285	33,4
Brandenburg	15	58	73	8,6
Goldcoast	-	49	49	5,7
Concord	29	-	29	3,4
Bredeney	6	11	17	2,0
London	9	-	9	1,1
Infantis	1	-	1	0,1

Tableau III : Répartition des sérotypes de *Salmonella* parmi les 853 isolats collectés dans les entreprises d'abattage et découpe de porc S1 et S2 lors de 7 campagnes de prélèvements

II. TYPAGE DE LA COLLECTION DE *SALMONELLA* ET DIVERSITE OBSERVEE

1. Sérotypage

Tous les isolats de *Salmonella* ont été sérotypés à l'AFSSA (Ploufragan et Paris). Les 314 prélèvements effectués ont permis d'isoler 853 isolats qui appartenaient à 8 sérotypes (**Tableau III**).

Les 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 près de 80% 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.

2. Pulsotypage et diversité génomique de *Salmonella* Typhimurium (ST) et de *Salmonella* Derby (SD)

Afin de déterminer les voies de dissémination des 2 sérotypes de *Salmonella* les plus fréquemment rencontrés au cours des campagnes de prélèvements (Typhimurium et Derby), la technique de pulsotypage avec 2 enzymes (*SpeI* et *XbaI*) a été appliquée aux 390 isolats de *Salmonella* Typhimurium (ST) et 285 isolats de *Salmonella* Derby (SD).

- *Salmonella* Typhimurium

Le pulsotypage a permis de distinguer 20 types de *Salmonella* **Typhimurium**, notés t1 à t20, distingués à la différence d'une bande près (**figure 2**). Ces types ont été regroupés en trois groupes I, II et III au seuil de 80 % de similitude. Le groupe le plus important en terme de génotypes le composant et en nombre d'isolats le constituant, c'est-à-dire le groupe II, regroupe :

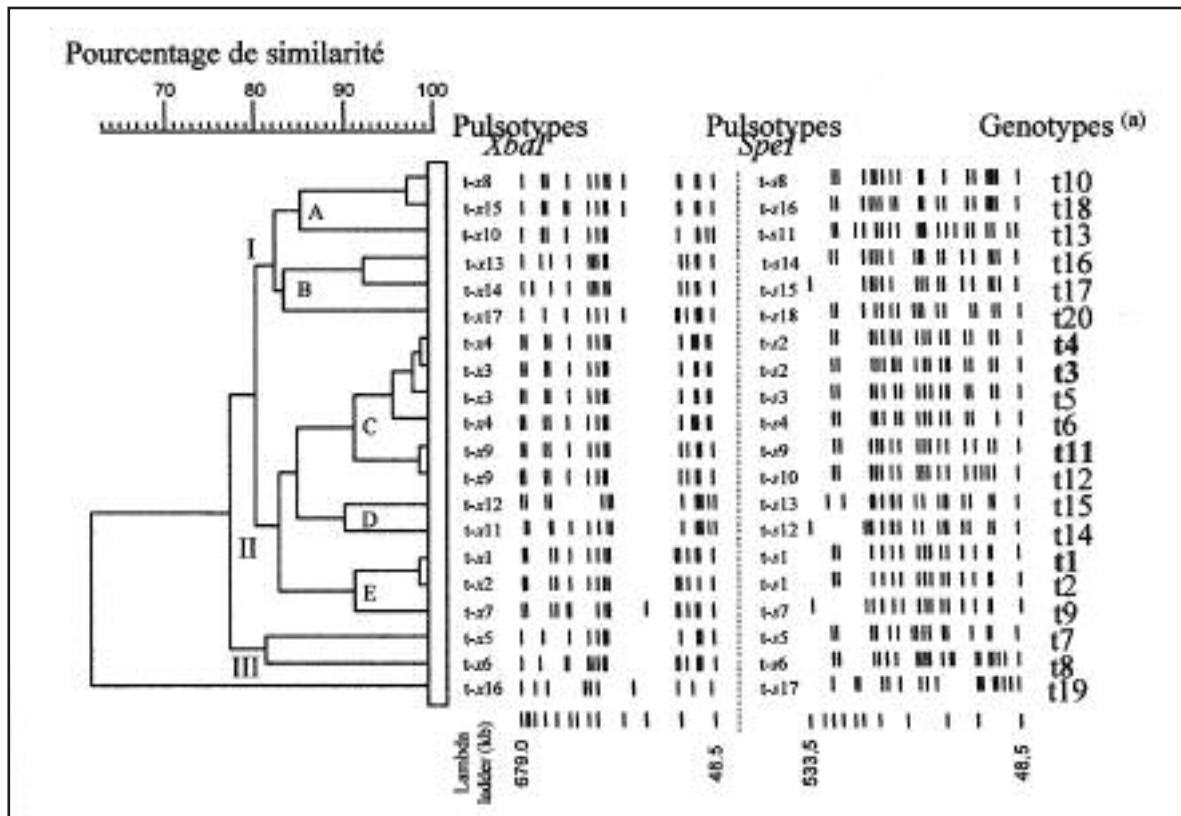


Figure 2 : Représentation schématique des pulsotypes *SpeI* et *XbaI* obtenus à partir de 390 isolats de *Salmonella* Typhimurium et dendrogramme associé (UPGMA, 1% de tolérance).

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

- tous les types de *S. Typhimurium* rencontrés dans les 2 entreprises simultanément (S1 et S2),
- tous les types de *S. Typhimurium* associés directement au porc (ganglions mésentériques ou peau).

- *Salmonella* Derby

Le pulsotypage a permis d'identifier 16 types différents parmi les 285 isolats de *Salmonella* Derby, notés d1 à d16 (**figure 3**).

Les types ont pu être regroupés en deux groupes, I et II. Il est également intéressant de noter que le génotype d1, associé au porc et très abondant, était présent à la fois dans S1 et dans S2.

L'étude de la diversité génomique de *Salmonella* a montré la prédominance dans les environnements des entreprises S1 et S2 de souches de *Salmonella* Typhimurium appartenant au groupe II, et du génotype d1 de *Salmonella* Derby qui sont directement associées aux animaux et qui sont présentes dans les deux entreprises.

Ceci peut venir du fait que ces deux 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.

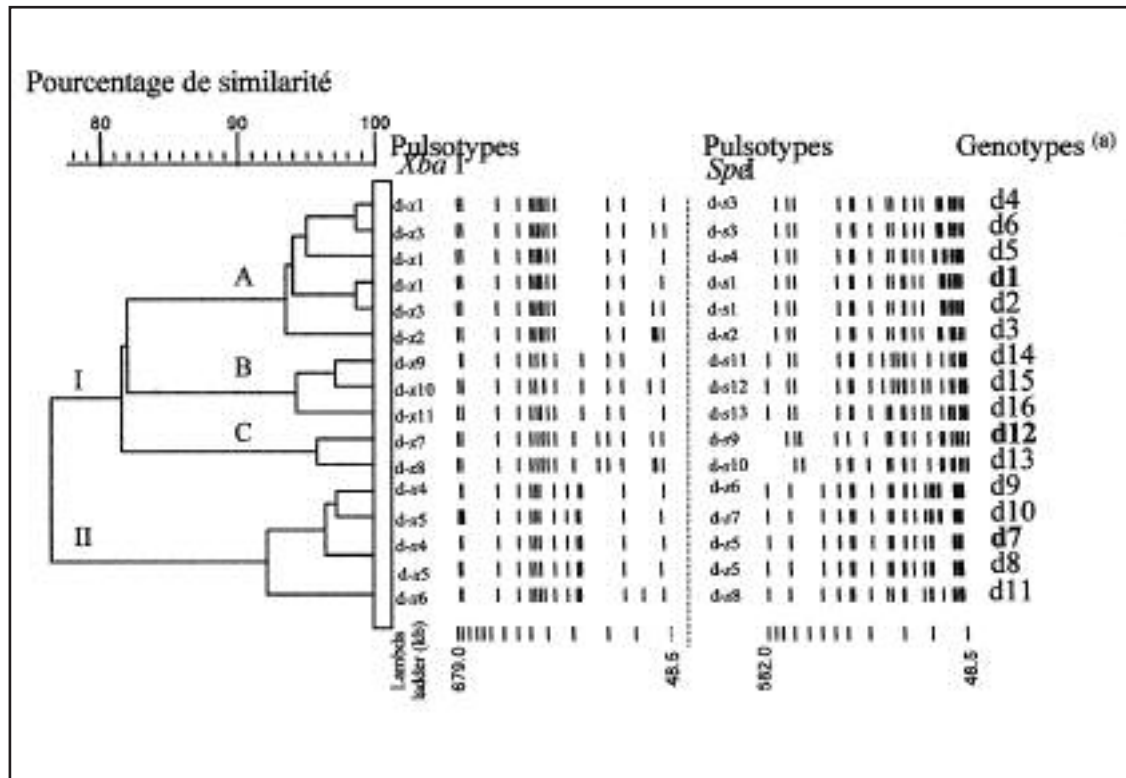


Figure 3 : Représentation schématique des pulsotypes *SpeI* et *XbaI* obtenus à partir de 285 isolats de *Salmonella* Derby et dendrogramme associé (UPGMA, 1% de tolérance).
 (a) Les génotypes notés en gras étaient communs aux 2 entreprises S1 et S2.

III. EXPLOITATION DES DONNEES DE PULSOTYPAGE POUR DETERMINER LA TRACABILITE DES CONTAMINATIONS PAR *SALMONELLA*

L'intégralité des résultats de cette étude a été publiée dans une revue internationale : GIOVANNACCI *et al.*, 2001.

Au cours de cet article, nous allons restituer un exemple précis de cartographie de la contamination par *Salmonella* de l'entreprise S2, au cours d'une série de prélèvements conduite avant reprise des activités le matin (décembre 1997) et d'une série conduite en cours d'activité (janvier 1998) (**tableau IV**).

Fin décembre 1997, différents sérotypes de *Salmonella*, Brandenburg, Bredeney, Goldcoast, ainsi que le type d7 de *Salmonella* Derby (groupe II de SD), ont été retrouvés au niveau de l'environnement de S2, avant reprise des activités le matin.

En janvier 1998, dans cette entreprise, les sérotypes et types de *Salmonella* retrouvés en cours d'activité étaient différents de ceux retrouvés un mois plus tôt.

Si le sérotype Brandenburg était présent, il provenait d'un portage asymptomatique des porcs abattus le jour même (présence dans les ganglions mésentériques des porcs) et n'a été retrouvé que sur des carcasses.

En outre, on peut constater la bonne concordance entre les types retrouvés dans l'environnement de l'abattoir et ceux contaminant les carcasses (t2, d3, d12, d16). Trois de ces types ont été identifiés au niveau des porcs vivants (t2, d3 et d16).

Au niveau de la découpe, une journée après l'abattage, les 3 types « porc » (t2, d3 et d16) ont à nouveau été retrouvés.

Les contaminations des pièces de découpe par *Salmonella* (t2, t11, t20 et d16) étaient :

Origine des *Listeria monocytogenes* et de *Salmonella*

- soit identiques aux types de l'environnement (t2 et d16), qui pouvaient être tracés jusqu'à l'abattoir,
- soit des carcasses (t11) puisque les types t11 (identifié comme un type porc ultérieurement

au niveau des ganglions) et t20 ont été identifiés au niveau de l'environnement et des carcasses du même lot le jour précédent.

Date de prélèvement	16 décembre 1997	13 et 14 janvier 1998
Points de prélèvements	Sérotypes de <i>Salmonella</i> et types de <i>Salmonella</i> Typhimurium (t) et de <i>Salmonella</i> Derby (d)	
PORC A L'ABATTOIR		
Porcs vivants		t2, d3, d16
Carcasses après saignée		d16
Carcasses après épilage		t2, d16, S.Brandeburg
Carcasses après fente ventrale		d3
Carcasses après éviscération		t2, d12, d16, S.Brandeburg.
Ganglions mésentériques		S. Brandeburg
ENVIRONNEMENT ABATTOIR		
Cases de stabulation	S. Brandeburg	d16
Tapis de saignée	S. Brandeburg	t2, d16
Eau d'échaudage	S. Goldcoast	
Epileuse	S.B., S.Goldcoast	t2, t20, d16
Table après épilage	S. Bredeney	t2, t20, d16
Polisseuse	d7, S.Bg., S.B., S.G.	t3, d12
Cylindre de détournage rosette		
Eviscération	S. Brandeburg	t3, t20, d2, d3, d16
Fendeuse		t20, d2, d3, d6
RESSUYAGE		
Carcasses après ressuyage		t11, t20, d2, d3
Sol salle de ressuyage		t20, d16
Paroi salle de ressuyage	S. Brandeburg	t20, d12
AVANT DECOUPE		
Carcasses avant découpe		t11, d3
Sol salle de stockage	S. Brandeburg	t11, t20
Paroi salle de stockage		
PIECES DE DECOUPE		
Jambons bruts (excision)		d16
Jambons bruts (chiffonnage)		
Poitrines DD (excision)		
Poitrines DD (chiffonnage)		t2, t11
Epaules DD (excision)		
Epaules DD (chiffonnage)		t20
ENVIRONNEMENT DECOUPE		
Table d'affalage		
Scie poitrine		
Scie jambon brut		t2
Tapis de convoyage jambon brut		
Environnement poitrines		t2, d3, d16
Environnement épaules		d3, d6, d16

Tableau IV : Distribution des types de *Salmonella* Typhimurium (t) et de *Salmonella* Derby (d) et autres sérotypes de *Salmonella* dans l'entreprise S2, au cours de 2 campagnes de prélèvements consécutives.

IV. CONCLUSIONS - ORIGINE DES *SALMONELLA* SUR LES PRODUITS DE DÉCOUPE DE PORC

Les travaux ont montré dans 2 entreprises industrielles que la contamination par *Salmonella* était composée de sérotypes et types variables de *Salmonella* suivant les campagnes de prélèvements.

Si des *Salmonella* étaient présentes le matin avant reprise des activités, l'ensemble des sérotypes et types rencontrés n'a jamais été le même au sein d'une même entreprise. Les souches de *Salmonella* apparaissaient donc labiles, c'est-à-dire non persistantes, contrairement à ce qui a pu être démontré dans le cas de *Listeria monocytogenes* (GIOVANNACCI *et al.*, 2000).

Ainsi, les contaminations par *Salmonella* des abattoirs et ateliers de découpe de porcs semblent être soumises à un turn-over lié aux lots de porcs abattus.

En conclusion, le pulsotypage a permis de mettre en évidence une chaîne d'événements concernant la contamination des pièces de découpe de porc par *Salmonella* (figure 4) :

Les pièces de découpe sont contaminées du fait de l'environnement de la découpe et directement de la contamination des carcasses. L'environnement des ateliers de découpe est contaminé du fait de la circulation de carcasses contaminées. La contamination des carcasses provient soit de l'environnement soit directement des porcs. L'environnement demeure contaminé en raison d'équipements peu nettoyables et également du fait de la circulation des porcs contaminés directement du fait de la présence de *Salmonella* dans leurs viscères et par l'excrétion qui contamine les cases et engendre des inter-contaminations.

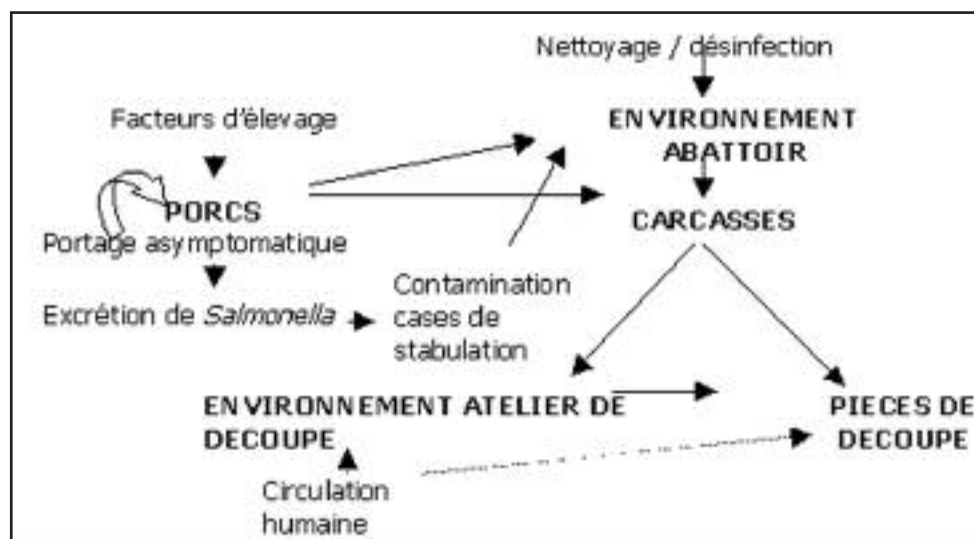


Figure 4 : Voies de transmission des *Salmonella*, de la stabulation des porcs à l'abattoir à la découpe, conduisant à la contamination des produits de découpe de porc.

Il apparaît que, compte tenu des pratiques industrielles d'abattage actuelles, tant que des porcs porteurs sains de *Salmonella* seront abattus, il semble difficile d'obtenir des carcasses exemptes de ce micro-organisme.

Seule la mise en place de bonnes pratiques d'hygiène au stade de l'élevage est susceptible de déboucher sur une réelle maîtrise d'un taux de prévalence très bas sur carcasses et pièces de découpe de porc ainsi qu'ont également pu le montrer les travaux de BERENDS *et al.* (1997 et 1998).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BERENDS B.R., VAN KNAPEN F., SNIJDERS J.M. et MOSSEL D.A. (1997) Identification and quantification of risks factors regarding *Salmonella* spp. on pork carcasses. *International Journal of Food Microbiology* **36**, 199-206.

BERENDS B.R., VAN KNAPEN F., MOSSEL D.A., BURT S.A. et SNIJDERS J.M. (1998) *Salmonella* spp. on pork at cutting plants and at retail level and the influence of particular risk factor. *International Journal of Food Microbiology* **44**, 207-217.

GIOVANNACCI I., VENDEUVRE J.L., ERMEL G., SALVAT G. et CARLIER V. (2000) 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***. *Bulletin de liaison du CTSCCV*, vol. 10, n° 3, mai-juin 2000, 171-178.

GIOVANNACCI I., QUEGUINER S., RAGIMBEAU C., VENDEUVRE J.L., ERMEL G., SALVAT G. et CARLIER V. (2001). Tracing of *Salmonella* spp. in two pork slaughter and cutting plants using serotyping and macrorestriction genotyping. *Journal of Applied Microbiology*, **90** : 131-147.

CONCLUSION GENERALE

Le pulsotypage est un outil de choix pour l'étude de l'épidémiologie des bactéries pathogènes dans les systèmes de production agro-alimentaires.

Cette technique est également très utile à l'échelle de l'entreprise, en permettant d'améliorer la sécurité des procédés :

Connaissance des types 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....

Vous souhaitez réaliser la caractérisation fine (pulsotypage) d'isolats de *Listeria monocytogenes* ou de *Salmonella* ?

Adressez-vous à :

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

La prestation comprend la réalisation du pulsotype, son archivage et sa confrontation à un fichier de données. Contactez-nous directement pour toute information concernant les délais et les tarifs d'analyse.

LEXIQUE (RAPPEL)

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 (en l'occurrence, le pulsotypage).

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 **lyso typage** (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 **types** 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 de *Salmonella* Typhimurium rassemblés dans le groupe II).

