



# Le pulstotypage : application à la connaissance de la transmission des souches en entreprises de transformation

INÈS GIOVANNACCI, CÉCILE GUIZARD ET AURORE ROMEY - CTSCCV

## RÉSUMÉ

Les travaux synthésés dans cet article avaient pour objectif d'apporter des éléments de connaissance sur la transmission des souches de *Listeria monocytogenes* trouvées sur les sites de transformation de la viande de porc.

Les travaux consistaient à caractériser par pulstotypage 750 isolats de *Listeria monocytogenes* provenant de cinq entreprises de charcuteries-salaisons (E1 à E5). Au total, 69 pulstotypes différents, rassemblés en 23 groupes génétiques, ont été identifiés. Parmi ceux-ci, cinq groupes génétiques (A, B, C, D et N) ont déjà été décrits au cours de travaux précédents en filière porc.

Les 8 groupes génétiques majoritaires de *Listeria monocytogenes* observés dans le cadre de cette étude étaient tous présents sur les matières premières entrant dans les sites de transformation, qu'elles soient carnées ou d'origine laitière.

Il est classique d'observer que les souches présentes sur matières premières soient retrouvées dans le secteur cru des entreprises. Toutefois, des souches de *Listeria monocytogenes* ont été également isolées du secteur sensible des entreprises de transformation, soit de façon temporaire, en des sites ponctuels (souches transitoires), soit de façon récurrente, en des sites multiples (souches résidentes).

## INTRODUCTION

Depuis le début des années 1990, des efforts considérables ont été consentis par les transformateurs de la viande de porc pour maîtriser le risque relatif à la présence de *Listeria monocytogenes* dans leurs produits.

Même si les taux de contamination des produits et l'incidence de la listériose sont devenus faibles (Goulet et al., 2001), *Listeria monocytogenes* peut toujours à l'heure actuelle être isolée de produits transformés à destination des consommateurs et provoquer des listérioses (de Valk et al., 2001).

Les souches de *Listeria monocytogenes* retrouvées de l'abattage de porcs à la transformation

en produits de charcuterie et de salaison commencent à être bien connues, notamment par le biais de deux programmes menés par le CTSCCV en collaboration avec l'AFSSA Ploufragan en abattage et découpe de porcs et dans les maillons ressuyage-découpe des carcasses et transformation de la viande de porc (Giovannacci et al., 2002).

Les travaux présentés dans cet article ont été menés dans le cadre d'un programme, financé par l'OFIVAL, qui avait pour objectif d'apporter des éléments de connaissance supplémentaires sur la transmission des souches de *Listeria monocytogenes* trouvées sur les sites de transformation de la viande de porc en produits de charcuterie et de salaison.

# Le pulsotypage : application à la connaissance de la transmission des souches en entreprises de transformation

Ces travaux consistaient à mobiliser des entreprises de transformation volontaires pour la réalisation de collecte d'isolats de *Listeria monocytogenes*. Ainsi, des *Listeria monocytogenes* provenant de matières premières, produits en cours de transformation, produits finis et d'environnement ont été collectés au sein de chaque entreprise volontaire, pour des durées variables de 1 mois à 2 ans. Ces *Listeria monocytogenes* ont été caractérisées par la technique devenue la référence pour la réalisation d'empreintes génétiques de bactéries pathogènes : le pulsotypage. Enfin, les données ont été analysées afin d'apporter des éléments de connaissance sur la diversité, la fréquence et les voies de transmission des principales souches observées.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### LES ENTREPRISES VOLONTAIRES

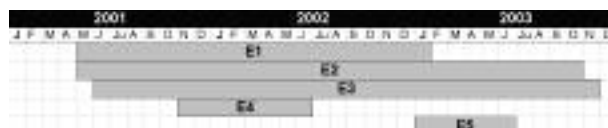
Cinq entreprises de transformation de la viande de porc, codées E1 à E5, ont participé à l'étude. Les lignes de production concernées par l'étude pour chacune des entreprises figurent dans le tableau I.

Code entreprise	Ligne de production suivie dans le cadre de l'étude
E1	Jambon cuit
E2	Charcuteries cuites
E3	Charcuterie cuite
E4	Charcuterie crue
E5	Ligne n°1 : pâté
	Ligne n°2 : Pieds panés

**TABLEAU I.** Ligne de production concernée par l'étude dans chaque entreprise volontaire.

### LA CONSTITUTION D'UNE COLLECTION DE *LISTERIA MONOCYTOGENES*

Des isolats de *Listeria monocytogenes* provenant des 5 sites de transformation et issus de matières premières, produits (en cours de transformation et finis) et d'environnement (secteur cru et secteur sensible), ont été collectés, avec un suivi dans le temps des contaminations pour plusieurs entreprises. Les durées de suivi de chaque entreprise sont rapportées dans le tableau II.



**TABLEAU II.** Période de collecte des isolats de *Listeria monocytogenes* pour les entreprises E1 à E5.

Pour les entreprises E1 à E4, les *Listeria monocytogenes* ont été isolées et identifiées à partir de 887 boîtes d'isolement, présumées positives, provenant d'analyses d'auto-contrôle. Pour chaque boîte d'isolement, l'identification d'une à trois colonies de *Listeria monocytogenes* a été réalisée par utilisation de gélose chromogène (Rapid'Lmono, Biorad) puis confirmation, le cas échéant, par réalisation de gales *Api Listeria* (biométrieux) et de test de CAMP.

Pour E5, 264 prélèvements ont été réalisés sur deux lignes de production distinctes au cours de quatre campagnes de prélèvements. Les prélèvements ont été réalisés par l'entreprise elle-même, sur la base d'un plan de prélèvements établi en collaboration avec le CTSCCV. Les prélèvements (matières premières, produits et chiffonnettes d'environnement) ont été analysés pour la recherche de *Listeria monocytogenes* au CTSCCV.

Pour les prélèvements sur matières premières et produits, la recherche de *Listeria monocytogenes* a été effectuée par la méthode validée AFNOR Rapid'Lmono (Biorad), suivant les instructions du fabricant.

Le protocole utilisé pour le traitement des prélèvements d'environnement était le suivant :

- pré-enrichissement dans 100 ml de milieu Fraser-demi, de 48 h à 30°C,
- enrichissement 24h à 37°C, en milieu Fraser complet,
- isolement sur gélose Rapid'Lmono (Biorad), incubation à 37°C, avec des lectures à 24 et à 48 h.

Au total, 725 isolats de *Listeria monocytogenes* ont été mis en conservation.

### LE PULSOTYPAGE

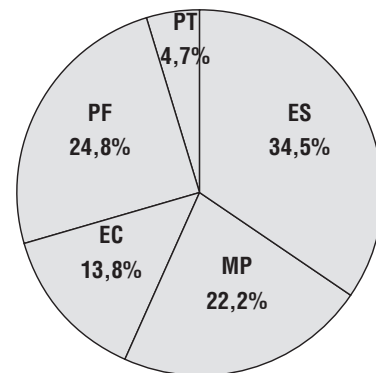
Le pulsotypage est considéré comme la technique moléculaire de référence pour le typage des bactéries pathogènes au niveau international.

CODE ENTREPRISE	Nombre de prélèvements / boîtes d'isolement traitées					Total
	PRODUITS			ENVIRONNEMENT		
	MP	PT	PF	Secteur cru	Secteur sensible	
E1	63	20		16	8	107
E2					77	77
E3	54	3	180	6	152	395
E4	1	1		2	1	5
E5	16	2		51	9	78
E5	27	8		25	3	63
<b>TOTAL</b>	<b>161</b>	<b>34</b>	<b>180</b>	<b>100</b>	<b>250</b>	<b>725</b>

**TABLEAU III.** *Origine des isolats de Listeria monocytogenes caractérisés par pulstotypage, répartis par entreprise et par site de prélèvement.*  
 MP : Matières premières, PT : produits en cours de transformation, PF : produits finis.

Le pulstotypage permet de créer des signatures ADN, assimilables à des code-barres bactériens. Cette technique (pulstotypage avec *ApaI*) a été appliquée à 725 isolats provenant des entreprises E1 à E5. Les origines de ces isolats sont mentionnées dans le tableau III.

La figure 1 donne les proportions relatives des isolats caractérisés pour chaque type de site de prélèvements.



**FIGURE 1.** *Répartition du nombre d'isolats de Listeria monocytogenes pulstotypés en fonction du site de prélèvement.*  
 MP : Matières premières ; PT : Produits en cours de transformation ; PF : Produits finis ; EC : Environnement secteur cru ; ES : Environnement secteur sensible

## L'ANALYSE DES DONNÉES

Les données produites ont été analysées en terme de :

- diversité des populations de *Listeria*,
- fréquence d'isolement des souches,
- voies de transmission au sein des entreprises de transformation.

groupe génétique rassemble de 1 à 10 pulstotypes.

## RÉSULTATS

### DIVERSITÉ DES LISTERIA

#### Diversité des souches observées dans le cadre de l'étude

Au total, 69 pulstotypes *ApaI* ont été identifiés parmi 725 isolats.

Les pulstotypes *ApaI* et les liens de similarité entre eux, représentés sur un dendrogramme, sont représentés sur la figure 2.

Les 69 pulstotypes ont été rassemblés en 23 groupes génétiques différents. Chaque

#### Comparaison avec les souches caractérisées au cours d'autres travaux

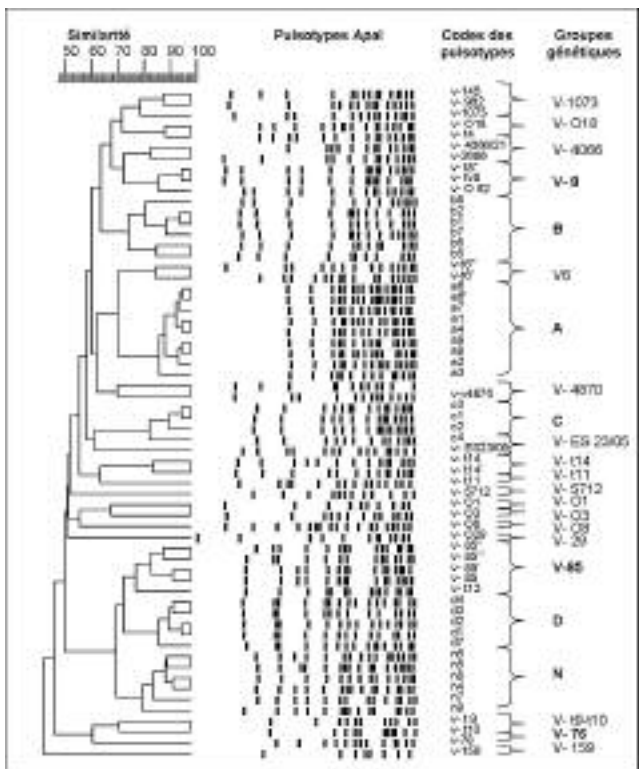
##### Les souches de la filière porc

La nomenclature des pulstotypes employée dans le cadre de cette étude est identique à celle employée dans un article précédent, restituant des travaux menés du ressuyage des carcasses jusqu'aux sites de transformation (Giovannacci, 2002).

Six groupes génétiques (**A, B, C, D, N et V-1073**) ont été identifiés dans le cadre des précédents travaux en filière porc de 1999 à 2001.

Parmi ceux-ci, les groupes **A, B et C** avaient été identifiés en abattage et découpe de porcs sur la période 1995-1996 – Programme "Origine des *Listeria monocytogenes* et des *Salmonella* pré-

# Le pulsotyping : application à la connaissance de la transmission des souches en entreprises de transformation



**FIGURE 2.** Représentation schématique des pulsotypes Apal regroupés en 23 groupes génétiques et liens de similarité associés (Indice de Dice et UPGMA). Les groupes génétiques majoritaires représentant plus de 1% du total sont mentionnés en caractère gras.

sentes sur les produits de découpe de porc” (Giovannacci et al., 1999).

## Les souches d’origines autres que le porc rencontrées en charcuterie-salaison

Le groupe **A** a également été identifié en abattage de volaille (Radas, 1999), et en abattage et transformation de viandes de volaille et de porc (Chasseignaux, 1999).

Les souches isolées de canard (foies et viande) dans le cadre de cette étude appartenaient aux groupes **A** et **D**.

Les souches isolées de lait dans le cadre de cette étude appartenaient au groupe **V-8**.

Parmi la diversité des souches observées en filière porc-charcuterie dans le cadre des présents travaux, 12 groupes (**A, B, C, D, N, V-85, V-8, V-1073, V-6, V-03, V-76, V-018**) ont également été observés en filière poissons fumés (Ragimbeau, 2002).

Par ailleurs, le groupe **N** rassemble des souches de sérotype 4b à l’origine d’épidémies de listériose (langue de porc en gelée, France, 1992 ; Vacherin, Suisse, 1987 ; lait pasteurisé, USA, 1983).

## FRÉQUENCE D’ISOLEMENT DES SOUCHES DE LISTERIA TROUVÉES EN TRANSFORMATION DE LA VIANDE DE PORC

La fréquence d’isolement des groupes génétiques majoritaires de *Listeria monocytogenes* a été analysée à trois niveaux selon :

- l’importance relative des groupes génétiques dans l’ensemble,
- la répartition des groupes génétiques d’une entreprise à l’autre,
- la répartition des groupes génétiques en fonction des sites d’isolement (matières premières, produits et environnement, en secteur et en secteur sensible).

## Fréquence d’observation des groupes génétiques de *Listeria monocytogenes*

Les groupes génétiques **A, B, C, D** et **N** représentent environ trois quarts (72%) des souches caractérisées dans le cadre de cette étude.

Ces cinq groupes représentaient plus de 90% des souches pulsotypées en abattage-découpe et transformation de la viande de porc dans le cadre de l’étude conduite en 1999-2001.

L’incidence de ces 5 groupes est sensiblement moins importante dans le cadre des présents travaux en raison d’un nombre élevé de souches du groupe **V-85**, isolées pour la plupart d’une seule entreprise qui a participé très activement au programme. Une idée plus réaliste de la représentativité des différents groupes génétiques pourrait être obtenue en compilant l’ensemble des données acquises au CTSCCV depuis 1996.

En particulier, **le groupe A**, associé au sérotype 1/2a, demeure majoritaire et représente **32,7 %** des souches pulsotypées dans le cadre de l’étude. Il représentait 90 % des souches caractérisées provenant d’abattage-découpe en 1995-1996

(Giovannacci et al.,1999) et 36% des isolats collectés de 1999 à 2001 en abattage-découpe et transformation de la viande de porc (Giovannacci et al., 2002). Ce groupe représente également une proportion importante des souches caractérisées en filière poissons fumés (22%) (Ragimbeau, 2002).

**Fréquence d’observation des groupes génétiques en fonction des entreprises**

Le nombre d’isolats des groupes génétiques majoritaires observé par entreprise est rapporté dans le tableau IV.

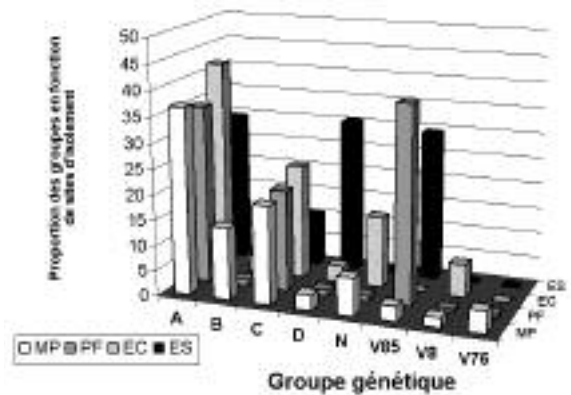
Les groupes génétiques majoritaires A, B, C, D, N, déjà décrits au cours de travaux précédents en filière porc, sont identifiables dans plusieurs entreprises.

En particulier, le groupe **A** est présent dans les 5 entreprises et sur les 2 lignes de production de E5. Le groupe **N** a été observé pour 4 entreprises dont les 2 lignes de production de l’entreprise E5. Les groupes **B**, **C** et **D** sont identifiables dans 4 cas sur 6 (4 entreprises dont une avec deux lignes de production).

Les groupes **V-85**, **V-8** et **V-76** sont identifiables uniquement dans les entreprises E3 et E5.

**LES VOIES DE TRANSMISSION DE LISTERIA MONOCYTOGENES**

La figure 3 illustre les proportions relatives des groupes génétiques majoritaires observés en



**FIGURE 3.** Proportion des groupes génétiques majoritaires de *Listeria monocytogenes* relativement aux sites d’isolement, toutes entreprises confondues.

MP : matières premières ; PF : produits finis ; EC : Environnement ; secteur cru ; ES : Environnement, secteur sensible.

fonction des sites d’isolement (matières premières, produits finis, environnement en secteur cru et environnement en secteur sensible), en considérant l’ensemble des données des cinq entreprises.

Trois cas de figure se présentent :

**- Groupes A et C**

La proportion de ces souches sur matières premières est très similaire à celle retrouvées sur produits finis et à celle retrouvée dans l’environnement en secteur cru et, dans une moindre mesure, dans le secteur sensible des entreprises.

GROUPES	ENTREPRISES						Total
	E1	E2	E3	E4	E5-L1	E5-L2	
A	15	3	154	3	43	19	237
B	25	4	7			3	39
C	36		69		13	8	126
D	15	68	3		2		89
N	11		3	1	3	7	25
V-85			148		3	4	154
V-8			1		5	4	10
V-76			2			6	8
Autres	5	2	8	1	9	12	37
<b>TOTAL</b>	<b>107</b>	<b>77</b>	<b>395</b>	<b>5</b>	<b>78</b>	<b>63</b>	<b>725</b>

**TABLEAU IV.** Nombre d’isolats de chaque groupe génétique majoritaire par entreprise.

# Le pulsotypage : application à la connaissance de la transmission des souches en entreprises de transformation

## - Groupes B, V-8 et V-76

Les souches appartenant à ces trois groupes sont identifiables sur matières premières avec une incidence faible à très faible. Leur incidence est faible à nulle sur l'environnement en secteur sensible et sur produits finis.

## - Groupes D et V-85

Les souches appartenant à ces deux groupes présentent une faible incidence sur matières premières et ont une incidence élevée dans l'environnement dans le secteur sensible des entreprises.

### **DISCUSSION : DIVERSITÉ ET TRANSMISSION DES SOUCHES DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* OBSERVÉES EN TRANSFORMATION DE LA VIANDE DE PORC**

Les 8 groupes génétiques majoritaires de *Listeria monocytogenes* observés dans le cadre de cette étude (A, B, C, D, N, V-85, V-8, V-76) sont présents sur les matières premières entrant dans les sites de transformation, qu'elles soient d'origine carnées (porc et volaille) ou laitières.

Ces groupes sont également identifiables en filière poissons (Ragimbeau, 2002).

Les groupes A, B, C, D et N ont déjà été décrits comme majoritaires dans le cadre des travaux menés en abattage-découpe et transformation de la viande de porc de 1999 à 2001.

Pour les souches des groupes A, B, C, N, V-8 et V-76, la transmission des souches au sein des entreprises varie en fonction des fréquences d'isolement observées sur les matières premières.

Quand la pression d'entrée des souches dans l'entreprise est suffisamment élevée, celles-ci peuvent être identifiées jusque dans le secteur sensible des entreprises.

C'est le cas dans cette étude pour les souches de groupes A et C, représentant 35% et 20% des souches retrouvées sur matières premières.

Ces deux groupes de souches représentent respectivement 30 et 10 % des souches retrouvées dans le secteur sensible des entreprises.

Par ailleurs, les souches des groupes B, N, V-8 et V-76 représentent de 2 à 12% des souches retrouvées sur matières premières. Ces souches n'ont pas été retrouvées dans le secteur sensible des entreprises, exceptée une souche du groupe N retrouvée sur un chariot.

Les procédures existantes dans les entreprises de transformation ne garantissent pas systématiquement l'étanchéité vis-à-vis de la contamination par *Listeria monocytogenes*. Les sites contaminés sont des sols, siphons, matériels de convoyage, matériels en contact ou non avec les produits. Certaines souches sont mises en évidence de façon ponctuelle et peuvent être qualifiées de souches transitoires. Elles sont véhiculées dans le secteur sensible des entreprises via un flux (matériel et/ou air et/ou personnel et/ou matière) en provenance du secteur cru. Toutefois, ces souches parviennent à être éliminées par les procédures de nettoyage et de désinfection existantes.

Lunden et al. (2002) ont montré qu'un trancheur de produits de viande cuite pouvait héberger des souches persistantes à l'origine de la contamination des produits finis. Ces souches ont montré une capacité d'adhésion à l'acier inoxydable supérieure à celle de souches transitoires. Lunden et al. (2003) ont montré en entreprises de transformation de produits carnés que les produits cuits sont contaminés par des souches dont la proportion est très nettement supérieure à celle retrouvée sur les produits avant cuisson. C'est le cas des souches de pulsotype V-85 dans cette étude. Comme dans le cas des présents travaux, les souches considérées comme résidentes dans les travaux de Lunden et al. (2002 et 2003) sont non seulement retrouvées de façon continue sur de longues périodes de temps mais aussi, elles sont retrouvées en des sites de prélèvement multiples dans les entreprises.

Un petit nombre de souches peut être observé de façon continue sur des périodes de temps

prolongées (plusieurs mois) sur des sites du secteur sensible de certaines entreprises (pulsotypes a3, d2 et v-85 notamment) et constitue ainsi des souches résidentes.

Toutefois, le caractère résident ou transitoire des souches ne dépend pas uniquement des propriétés particulières exprimées par ces souches puisque certains pulsotypes trouvent les conditions de résidence dans certaines entreprises et pas dans d'autres.

## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Une collection d'isolats de *Listeria monocytogenes* provenant de 264 prélèvements et 887 données d'auto-contrôle dans cinq entreprises de charcuterie et de salaisons a été constituée. Parmi cette collection 725 isolats, provenant de matières premières, de produits en cours de transformation, d'environnement et produits finis, isolés au cours de 3 années 2001, 2002 et 2003, ont été caractérisés par pulsotypage.

Les 725 isolats ont présenté 69 pulsotypes différents, rassemblés en 23 groupes génétiques d'importance quantitative variable. Les 8 groupes génétiques majoritaires de *Listeria monocytogenes* observés dans le cadre de cette étude (**A, B, C, D, N, V-85, V-8, V-76**) sont tous présents sur les matières premières entrant dans les sites de transformation, qu'elles soient carnées d'origine porc (A, B, C, D, N, V-85, V-76), d'origine volaille (A et D) ou laitière (V-8). Ces groupes ne semblent pas présenter de spécificité de filière dans la mesure où ils sont tous identifiables en filière poissons fumés.

<sup>1</sup> Origine et propriétés spécifiques des *Listeria monocytogenes* isolées de la filière porcine, de l'élevage à la distribution - Analyse des liens avec des isolats issus des cas humains de listériose. Programme à financement AQS (MAPAAR) et OFIVAL, Partenaires : CTSCCV, AFSSA, Institut Pasteur, ENVA, Association ASA et FICT.

La contamination en *Listeria monocytogenes* des sites de transformation dans le secteur cru est inévitable dans la

mesure où les matières premières sont contaminées par la bactérie. Il a été constaté que des souches de *Listeria monocytogenes* peuvent également être isolées du secteur sensible des entreprises, soit de façon temporaire (souches transitoires), soit de façon récurrente (souches résidentes).

Un nouveau programme de recherche conduit par le CTSCCV<sup>1\*</sup> (en cours de réalisation) permettra de comparer des souches issues des maillons élevage, abattage-découpe et transformation, produits à la distribution et souches issues de cas cliniques par pulsotypage et d'étudier plus particulièrement les propriétés de certaines d'entre elles (nouvelles techniques de typage moléculaire, propriétés de croissance, d'adhésion, de résistance aux désinfectants et de thermorésistance).

## REMERCIEMENTS

Ces travaux ont bénéficié d'un financement OFIVAL. Les résultats complets de ces travaux ont été restitués dans un rapport, remis à l'OFIVAL en décembre 2003.

Par ailleurs, le CTSCCV remercie les entreprises volontaires ayant participé à la production des données.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

CHASSEIGNAUX E. (1999). Écologie de *Listeria monocytogenes* dans les ateliers de transformation de viandes de volailles et de porcs. *Thèse de doctorat de troisième cycle*, Université Claude Bernard, Lyon-I.

DE VALK H., VAILLANT V., JACQUET C., ROCOURT J., LE QUERREC F., STAINER F., QUELQUEJEU N., PIERRE O., PIERRE V., DESENCLOS J.C. et GOULET V. (2001). Two consecutive nationwide outbreaks of listeriosis in

## Le pulsotypage : application à la connaissance de la transmission des souches en entreprises de transformation

France, October 1999-February 2000. *American Journal of Epidemiology* **154** (10), 944-950.

GIOVANNACCI I., RAGIMBEAU C., QUEGUINER S., SALVAT G., VENDEUVRE J.L., CARLIER V. et ERMEL G. (1999). *Listeria monocytogenes* in pork slaughtering and cutting plants : Use of RAPD, PFGE and PCR-REA for tracing and molecular epidemiology. *International Journal of Food Microbiology* **53**, 127-140.

GIOVANNACCI I., VENDEUVRE J.L., ERMEL G., PISSAVIN C., TOQUIN M.T., MICHEL Y. et CARLIER V. (2002). *Listeria monocytogenes* et *Salmonella* dans la filière porc : étude des contaminations du ressuyage des carcasses à la transformation en produits de charcuterie et de salaison. *Bulletin de Liaison du CTSCCV* **2** (12), 7-18.

GOULET V., DE VALK H., PIERRE O., STAINER F., ROCOURT J., VAILLANT V., JACQUET C. et

DESENCLOS J.C. (2001). Effect of preventive measures on incidence of human listeriosis, France, 1987-1997. *Emerging Infectious Diseases* **7** (6), 983-989.

LUNDEN, J.M., AUTIO T.J., ET KORKEALA H.J. (2002). Transfer of persistent *Listeria monocytogenes* contamination between food-processing plants associated with a dicing machine. *Journal of Food Protection* **65** (7), 1129-1133.

LUNDEN J.M., AUTIO T.J., SJOBERG A.M. et KORKEALA H.J. (2003). Persistent and non persistent *Listeria monocytogenes* contamination in meat and poultry processing plants. *Journal of Food Protection* **66** (11), 2062-2069.

RAGIMBEAU C. (2002). Caractérisation des populations de *Listeria monocytogenes* dans la filière poissons fumés : étude de la variabilité génétique et influence de la matrice sur l'expression de la virulence. *Thèse de doctorat de troisième cycle*, Université des sciences et technologies de Lille.

### POUR TOUT RENSEIGNEMENT COMPLÉMENTAIRE, CONTACTER

INÈS GIOVANNACCI, INGÉNIEUR PROJETS  
CTSCCV – 7, AVENUE DU GÉNÉRAL DE GAULLE  
94704 MAISONS-ALFORT CEDEX  
TÉL. : 01 43 68 57 85 – FAX : 01 43 76 07 20  
E-mail : [igiovannacci@vet-alfort.fr](mailto:igiovannacci@vet-alfort.fr)