

DETERMINATION DE L'ORIGINE DE LA CONTAMINATION EN *LISTERIA MONOCYTOGENES* DE PRODUITS DE DECOUPE DE PORC PAR MISE EN OEUVRE D'OUTILS DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

Giovannacci I.¹, Ermel G.², Ragimbeau C.², Salvat G.²

A variety of food products had been linked with human cases of listeriosis in the last few years. Hence, *Listeria monocytogenes* has become of major concern for food industries and public health authorities. Especially, delicatessen products had been associated with sporadic cases and epidemic outbreaks of listeriosis in France. The aim of this study was to determine the source of contamination with *Listeria monocytogenes* of pork cuts by means of molecular tools. This work was carried out by the CTSCCV (Centre Technique des Salaisons, Charcuterie et Conserves de Viandes), in collaboration with the CNEVA (Centre National d'Etudes Vétérinaires et Alimentaires). 303 isolates of *Listeria monocytogenes*, obtained from five pig slaughtering and cutting processing plants (live pigs, carcasses, cuts, cutting tools and environment), were characterized by the use of RAPD and RFLP/PFGE methods. Using the RAPD technique, the combination of patterns obtained with 5 different primers (PB4, Lis11, Lis5, HLWL74 and UBC127) detected 21 groups between the 303 isolates. Using the RFLP/PFGE technique, the enzyme *Apal* gave 23 different profiles. Results obtained for both methods were closely related. The used techniques allowed to trace several strains of *Listeria monocytogenes* within each plant. A particular strain seemed to be well adapted to the pig processing environment. In fact, the strain characterized as type RAPD I / PFGE 1 appeared to be not only widespread within two plants, from live pigs to cuts, but also from a plant to another. Moreover, this strain and some others had been found from time to time in the same plant, even after cleaning and disinfection procedures. This fact highlights the possibility for some strains to persist in the pig processing environment and raises the problem of the efficiency of cleaning and disinfection procedures employed in pig slaughterhouses and cutting rooms.

INTRODUCTION

Depuis quelques années, des cas de listériose humaine ont pu être associés à la consommation de produits alimentaires. Etant donné l'importance de *Listeria monocytogenes* en terme de santé publique et son incidence d'un point de vue économique, la gestion du risque associé à ce micro-organisme pathogène est devenue l'objet d'une préoccupation majeure, aussi bien pour les industriels que pour les autorités. En particulier, des produits de charcuterie ont été incrimés dans des épidémies de listérioses (Rocourt et al., 1993). Dans une volonté de maîtrise de la qualité des matières premières, le Centre Technique de la Salaison, de la Charcuterie et des Conserves de Viandes (CTSCCV) a initié, en collaboration avec le Centre National d'Etudes Vétérinaires et Alimentaires (CNEVA) de Ploufragan, un programme ayant pour objectif de connaître l'origine de la contamination en *Listeria monocytogenes* des produits de découpe de porc. Ces dernières années, l'intérêt des techniques issues de la biologie moléculaire a été largement démontré pour identifier l'origine des infections et contaminations, des animaux destinés à l'abattage jusqu'aux produits transformés. Ainsi, le but de ce travail était de déterminer la traçabilité de souches de *Listeria monocytogenes*, des porcs vivants arrivant à l'abattoir aux produits de découpe par mise en oeuvre d'outils de biologie moléculaire, en particulier les techniques RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) et RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) / PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis) complétées par une technique PCR (Polymerase Chain Reaction) / REA (Restriction Enzyme Analysis).

MATERIELS ET METHODES

• Souches de *Listeria monocytogenes*

La collection bactérienne ayant servi à la réalisation de cette étude était constituée de 303 isolats de *Listeria monocytogenes* récoltés lors d'enquêtes de terrain dans cinq entreprises françaises d'abattage et découpe de porc, désignées par les notations E1 à E5, toutes appartenant à la même région de production, à l'exception de E4. La plupart des souches étudiées ont été isolées en 1995. Ces isolats provenaient de lots de porcs (porcs vivants, carcasses en fin de chaîne d'abattage et carcasses à la sortie du premier ressuyage), des locaux et matériels des abattoirs, du ressuyage et des ateliers de découpe, après les opérations de nettoyage et désinfection et en cours d'activité, et, enfin, de diverses pièces de découpe. Pour chaque entreprise, les prélèvements ont été répartis au cours d'une journée d'activité et ont concerné des lots de porcs issus de différents élevages. Les prélèvements dans les zones d'abattage et ateliers de découpe ont été espacés par des intervalles allant de trois semaines à deux mois.

¹ Centre Technique de la Salaison, de la Charcuterie et des Conserves de Viandes. 7, avenue du Général-de-Gaule, 94704 Maisons-Alfort Cedex, France

² CNEVA Ploufragan - Unité Hygiène et Qualité des Produits Avicoles et Porcins - B.P. 53, 22440 Ploufragan, France

Des prélèvements réalisés en 1996 ont concerné les entreprises E3 et E5. Ils ont été effectués après les opérations de nettoyage et désinfection, dans les zones d'abattage et de ressuyage pour E3 et E5 et de l'atelier de découpe pour E5. Toutefois, près de la moitié des souches issues de ces campagnes de prélèvement n'a pu être conservée.

- **RAPD.** La technique RAPD a été appliquée à l'ensemble des isolats successivement avec cinq amorces : HLWL74 (Mazurier et Wernars, 1992), PB4 (Boerlin et al., 1995), UBC127 (Farber et Addison, 1994), Lis 5 et Lis 11 (non publiées). Les produits d'amplification ont alors été séparés sur gel d'agarose à 1.5 % coloré avec du BET. L'acquisition des profils a été réalisée par photographie polaroid sous lumière UV.
- **RFLP/PFGE.** La macrorestriction de l'ADN de *Listeria monocytogenes* a été réalisée avec *Apa I* (Brosch et al., 1991). La séparation des fragments d'ADN a été réalisée par électrophorèse en champ pulsé de l'ADN, à l'aide du dispositif CHEF DRII (Biorad). Les profils ont été acquis de la même façon que pour la RAPD.
- **PCR/REA.** Consécutivement aux analyses RAPD et RFLP/PFGE, cette technique (Ericsson et al., 1995) a consisté à amplifier par PCR un fragment de 2.9 kb d'ADN de *Listeria monocytogenes* contenant des régions des gènes *inlA* et *inlB* impliqués dans la virulence, à l'aide du couple d'amorces Lip23/Lip32. Le produit d'amplification a alors été digéré par *AluI* et les fragments ont été séparés sur gel d'agarose à 2.5 %.

RESULTATS

• Types de *Listeria monocytogenes* obtenus par RAPD.

A partir de la collection des 303 isolats étudiés, les amorces PB4, Lis11, Lis5, HLWL74 et UBC127 ont respectivement généré 5, 11, 11, 16 et 17 empreintes différentes. Un numéro arbitraire a été affecté à chaque empreinte obtenue avec une amorce donnée (tableau I). L'analyse des résultats obtenus avec les cinq amorces a fourni 21 profils RAPD différents, désignés par les chiffres romains I à XXI. Le type RAPD I représente à lui seul 67.7% du souchier. Certains types RAPD sont très proches les uns des autres comme I, II, III et IV, XII et XIII, VI et VII, VIII et IX, X et XI. Au contraire, les types RAPD XIV à XXI sont très hétérogènes.

Tableau I
Types RAPD (PB4, Lis11, Lis5, HLWL74, UBC127) identifiés parmi 303 isolats de *Listeria monocytogenes*
* Pourcentage d'isolats de *Listeria monocytogenes* correspondant aux profils RAPD dans la collection étudiée.

PB4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	3	4	5
Lis11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9	9	2	5	6	6	10	11	3	4	7	8
Lis 5	1	1	1	1	1	1	1	10	10	9	9	2	2	5	6	9	11	3	4	7	8
HLWL74	1	6	6	7	14	13	13	12	15	11	16	2	5	8	9	16	14	3	4	3	10
UBC 127	1	1	6	7	17	11	14	11	11	13	13	2	5	8	9	15	16	3	4	10	12
Type RAPD	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV	XV	XVII	XVIII	XI	XX	XX
%*	67.5	4	6.3	0.3	0.7	1	2.7	5	0.3	4.3	1.7	2.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.7	0.7	0.7

• Types de *Listeria monocytogenes* obtenus par RFLP/PFGE.

La technique RFLP/PFGE a permis de distinguer au sein du souchier 23 types de *Listeria monocytogenes*. Des numéros arbitraires ont été affectés à chaque profil RFLP/PFGE, noté en caractères gras (Tableau II). Le type PFGE 1 représente à lui seul 65% du souchier. Les types PFGE 1, 6, 10, 11 et 22, très proches entre eux, représentent 87.5% des souches étudiées. De même, les types 14, 15, 16 et 22, les types 13, 20, 21, et 23 et enfin les types 2 et 5 sont très proches entre eux. A coté de cela, les types 3,4,7,8,9,12,17 et 18 sont très différents entre eux et par rapport aux types PFGE déjà cités.

Tableau II
Types RFLP/PFGE (*Apal*) identifiés parmi 303 isolats de *Listeria monocytogenes*
* Pourcentage d'isolats de *Listeria monocytogenes* correspondant aux types PFGE dans la collection étudiée.

Type PFGE	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
%*	64.5	1	0.3	0.3	1.7	6.3	0.3	0.3	0.7	4	3.7	0.7	4.3	5	1	2.7	0.3	0.3	0.3	0.3	1	0.7	0.3

• Résultats analyse PCR/REA.

Cette technique, mise en oeuvre sur des souches de *Listeria monocytogenes* représentatives des types PFGE les plus fréquents dans le souchier étudié, a permis de générer deux sortes de profils. Selon Ericsson et al.(1995), ces deux empreintes peuvent être corrélées à l'appartenance des souches correspondantes aux sérovars 1/2a ou 1/2b pour les souches de type PFGE 1, 6, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 19, 20, 21, 22, 23 et aux sérovars 1/2c ou 3b pour les souches de type PFGE 2 et 5.

DISCUSSION - CONCLUSION

L'application des techniques RAPD avec 5 amorces et RFLP/PFGE avec *Apal* aux 303 isolats de *L. monocytogenes* étudiés a fourni respectivement 21 et 23 empreintes génomiques différentes. Les analyses RAPD et RFLP/PFGE ont montré une bonne corrélation entre elles car elles ont permis de regrouper en types génomiques les mêmes isolats. Par exemple, les souches de type PFGE 1 sont les mêmes que les souches de type RAPD I. Par ailleurs, les souches de type RAPD I correspondent aux types PFGE 1 et 11. Les souches de type RAPD XI correspondent aux types PFGE 20, 21 et 23. Dans cette étude, la technique RFLP/PFGE s'est

révélée plus discriminante que la RAPD. La technique PCR/REA d'après Ericsson et al. (1995) a donné une indication sur les sérotypes qu'il conviendrait de confirmer par les méthodes classiques.

Les analyses RAPD et RFLP/PFGE ont permis de montrer une traçabilité de souches de *Listeria monocytogenes* en différents sites de chaque entreprise, c'est à dire que les isolats, regroupés en types génomiques, ont pu être identifiés à différents stades de la production et en différents sites. Les établissements E1 et E5 ont présenté une homogénéité dans la nature des contaminations en *Listeria monocytogenes*, avec une omniprésence de la souche de type RAPD I / PFGE 1. Cette souche a pu être isolée de porcs vivants, de carcasses en fin de chaîne d'abattage et à la sortie du premier ressuyage, des locaux et matériels des zones d'abattage et ateliers de découpe, à la fois en cours d'activité et après les opérations de nettoyage et désinfection, et enfin de diverses pièces de découpe. Non seulement la souche de type RAPD I / PFGE 1 a été isolée en 1995 des entreprises E1 et E5, à des intervalles de temps allant de 21 à 50 jours, mais, également, elle a été isolée de l'entreprise E5, une année plus tard, après les opérations de nettoyage et désinfection. L'établissement E3, où les prélèvements n'ont été réalisés qu'en abattage et ressuyage, est caractérisé par une contamination, en 1995, essentiellement composée des souches de types RAPD III / PFGE 6 et RAPD VIII / PFGE 14, que ce soit en cours d'activité ou après les opérations de nettoyage et désinfection. En 1996, les mêmes types de souches étaient présents dans les locaux de ressuyage de E3, après nettoyage et désinfection, cotoyant des souches appartenant aux types RAPD II / PFGE 10, RAPD I / PFGE 11 ainsi que des souches de types RAPD VI / PFGE 15, RAPD VII / PFGE 16. Le cas de l'entreprise E4 (7 isolats) n'est intéressant que dans la mesure où celle-ci est située dans une région éloignée des autres entreprises et qu'on y a isolé des souches de type RAPD I / PFGE 1. Dans le cas de l'entreprise E2, la nature des contaminations était différente entre la zone d'abattage et l'atelier de découpe. La souche de type RAPD I / PFGE 1 a été isolée dans la zone d'abattage sur les porcs vivants, sur les carcasses et dans les locaux en cours d'activité. Dans l'atelier de découpe, la contamination est apparue plus variée. La souche de type RAPD I / PFGE 1 n'y a pas été isolée mais on a pu relever la présence de la souche de type RAPD X / PFGE 13, à la fois sur des pièces de découpe et sur les matériels en contact avec les pièces, ainsi que des souches de types RAPD XI / PFGE 20,21 et 23, RAPD III / PFGE 6 et RAPD V / PFGE 22, laissant supposer l'existence de sources de contamination diverses.

Il est intéressant de remarquer que certaines souches, particulièrement la souche de type RAPD I / PFGE 1, la souche de type RAPD X / PFGE 13, mais aussi les souches de types RAPD XII et XIII, correspondant aux souches de types PFGE 2 et 5, ont été isolées d'entreprises différentes et géographiquement très éloignées, ce qui pourrait impliquer des sources de contaminations identiques.

Une souche de *Listeria monocytogenes* semble remarquablement bien adaptée à l'environnement de la filière porc. En effet, la souche de type RAPD I / PFGE 1 a pu être isolée de supports très variés (tapis, ventilateurs, plafonds, porcs vivants, muscles, gras, couenne ...) dans des conditions de température, d'humidité et de substrat très hétérogènes. Par ailleurs, cette souche était présente, à un moment donné, en plusieurs lieux et, à une année d'intervalle, en un même lieu, y compris après les opérations de nettoyage et désinfection. Ceci amène la question de l'existence possible de souches résidentes dans les locaux d'exploitation et conduit à s'interroger sur les moyens de maîtrise à mettre en oeuvre, notamment les mesures préventives (efficacité du nettoyage et de la désinfection).

REFERENCES

- Boerlin P., Bannerman E., Ischer F., Rocourt J. and Bille J., 1995. Typing *Listeria monocytogenes* : a comparison of Random Amplification of Polymorphic DNA with 5 other methods. Res. Microbiol., 46 : 35-49.
- Brosch R., Buchrieser C. and Rocourt J., 1991. Subtyping of *Listeria monocytogenes* by use of low-frequency-cleavage restriction endonucleases and pulsed-field gel electrophoresis. Res. Microbiol., 142 : 667-675.
- Ericsson H., Stalhandske P., Danielsson-Tham M.-L., Bannerman E., Bille J., Jacquet C., Rocourt J. and Tham W., 1995. Division of *Listeria monocytogenes* serovar 4b strains into two groups by PCR and Restriction Enzyme Analysis. Applied and Environmental Microbiology, 61 (11), 3872-3874.
- Farber J.M. and Addison C.J., 1994. RAPD typing for distinguishing species and strains in the genus *Listeria*. Journal of Applied Bacteriology, 77 : 242-250.
- Mazurier S.-I. and Wemars K., 1992. Typing of *Listeria* strains by Random Amplification of Polymorphic DNA. Res. Microbiol., 143 : 499-505.
- Rocourt J., Goulet V., Lepoutre A., Dehaumont P. and Veit P., 1993. Epidémiologie de la listériose. J.A.N.D., 22 octobre 1993.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient I. Corrége, de l'Institut Technique du Porc, pour sa collaboration.