

EPIDEMIOLOGIE DE LA CONTAMINATION DU LAIT A LA FERME PAR LISTERIA MONOCYTOGENES

Synthèse des principaux résultats *

M. SANAA [1]

RESUME

La prévalence de L. monocytogenes dans le lait, observée dans la zone de notre étude, était de l'ordre de 3%.

Une première partie de nos travaux a consisté à réaliser une enquête cas/témoins où nous avons testé l'effet d'un certain nombre de paramètres d'élevage sur la contamination du lait de tank. A l'aide d'une régression logistique, nous avons montré que le risque de contamination du lait est significativement augmenté lorsque les ensilages sont mal conservés (pH supérieur à 4), lorsque la propreté des animaux et l'entretien des aires d'exercice sont insuffisants et lorsque les conditions d'hygiène de traite ne sont pas scrupuleusement respectées.

Par ailleurs, la contamination de l'environnement (deuxième partie de l'étude), évaluée par la présence de L. monocytogenes dans les bouses et les ensilages, chez 24 élevages cas et 26 élevages témoins, multiplie le risque de contamination du lait par un facteur 20.

Dans une troisième partie, les élevages cas ont été suivis pendant deux années avec un rythme mensuel. Nous avons entrepris, dans 33 d'entre eux, des recherches de sources de contamination. Sur les 1409 vaches prélevées, trois appartenant à des élevages différents ont été confirmées excrétrices de L. monocytogenes par la voie mammaire. Ces trois vaches étaient atteintes de mammite subclinique à Listeria monocytogenes sérotype 1/2 dans un cas et sérotype 4 dans les deux autres. La majorité des souches de Listeria monocytogenes isolées est du sérotype 1/2 (87%). Les souches du sérotype 4 n'ont pas été isolées à partir des ensilages et sont peu fréquentes dans les matières fécales. L'examen des correspondances des souches isolées dans une même exploitation entre elles, montre la vraisemblance de la chaîne de contamination dont la source principale est l'ensilage, les vecteurs sont les bouses et les animaux, et le mode de contamination, la traite ou directement le lait.

Mots-clés : Bovin, Epidémiologie, Lait cru, Listeria monocytogenes, Listeria spp, Lysotypie, Mammite, Qualité bactériologique.

* Thèse de Doctorat de l'Université Paris XI, Faculté de Médecine Paris-Sud, Spécialité : Epidémiologie, soutenue par Moez Sanaa le 17 février 1993

[1] Institut de l'Elevage

Adresse actuelle : Laboratoire d'épidémiologie et de gestion de la santé animale de l'E.N.V.A., 94704 Maisons-Alfort, France



SUMMARY

An epidemiologic study was undertaken to determine the incidence and origin of Listeria monocytogenes in raw bulk tank milk in a limited geographic area in France. The prevalence of Listeria monocytogenes was low (3%).

The first step was a case/control survey involving 128 selected dairy farms. The objective was to assess the association of a number of suspected risk factors upon the odds of the contamination of raw milk by Listeria monocytogenes. Poor quality of silage, inadequate frequency of cleaning the exercise area, poor cow cleanliness, insufficient lighting of milking barns and parlors and incorrect disinfection of the towels between milkings were conditionally associated with milk contamination.

The association between fecal material, silage and raw milk was examined on 24 case farms and 26 control farms (second step). Fecal material and silage were considered to be a potential source of raw milk contamination by Listeria monocytogenes.

Seasonal variation of the occurrence of Listeria monocytogenes in the raw bulk tank milk was examined on 62 case farms (third step) during a period of two years. Possible sources of exogenous and endogenous contamination of raw milk was investigated on 33 dairy farms. The most common Listeria monocytogenes isolates from dairy environment belonged to serogroup 1/2 (87%). Isolates of serogroup 4 were not observed from silage and were infrequently from feces and teats. During the course of our investigation, three herds were found to contain one animal with subclinical mastitis caused by Listeria monocytogenes serogroup 1/2 in one case and serogroup 4 in two cases. When we interpreted the results of phage typing on matching strains isolated from tank milk with those recovered from quarter milk and environmental samples, we observed a good agreement between the source strains and raw tank milk strains.

Key words : Bovine, Epidemiology, Raw milk, Listeria monocytogenes, Listeria spp., Phage-typing, Mastitis, Bacteriology quality.

I - INTRODUCTION

Listeria monocytogenes est actuellement reconnu comme un agent pathogène d'origine alimentaire (Farber et Peterkin, 1991). Au cours des années 80, des épidémies de listériose humaine recensées en Amérique du Nord et en Europe ont mis en évidence le rôle étiologique de certains aliments tels les végétaux (Schlech et al., 1983), le pâté (Mc Lauchlin, 1991), et les produits laitiers, en particulier les fromages à pâte molle (Bille, 1990 ; Linan et al., 1988 et Flemming et al., 1985). Récemment, Schuchat et al. (1992) et Pinner et al. (1992) ont montré que 32% des cas sporadiques sont également d'origine alimentaire et sont associés à la consommation de hot dogs non réchauffés, de poulets mal cuits, de divers fromages à pâte molle et d'aliments achetés chez des traiteurs.

Bien que les aliments contaminés soient à l'origine de la grande majorité des cas de listériose épidémique ou sporadique, la plupart des personnes sont à faible risque de listériose.

En effet, la listériose touche essentiellement des personnes dont le système immunitaire est affaibli ou modifié, comme les immunodéprimés, les nouveau-nés, les femmes enceintes ou les patients sous traitement à base de corticoïdes (Mc Lauchlin, 1990).

Grâce au développement des techniques analytiques, la présence de L. monocytogenes a pu être mise en évidence dans la plupart des produits destinés à la consommation humaine (Farber et Peterkin, 1991).

Le lait cru est une source bien connue de L. monocytogenes et a été mis en cause dans l'épidémie de Californie en 1985 où le lait cru a été malencontreusement utilisé dans la fabrication d'un fromage de type mexicain (Linnan et al., 1985).

La pasteurisation est un moyen efficace de destruction des agents pathogènes, notamment *L. monocytogenes*, et permet ainsi d'utiliser une matière première non contaminée. Mais la pasteurisation ne peut être appliquée aux fromages au lait cru.

En France, la production au lait cru représente près de 12 % du tonnage annuel et environ le quart du chiffre d'affaire fromager. Cependant, *L. monocytogenes* a été également isolé dans les fromages au lait pasteurisé (WHO, 1988). Ce qui montre que les problèmes de contamination par *L. monocytogenes* ne sont pas seulement limités aux produits crus mais sont aussi à considérer dans le cas des produits pasteurisés où la recontamination à partir de l'environnement reste possible.

La maîtrise des risques de contamination doit être envisagée non seulement lors de la transformation, mais aussi sur les sites mêmes de production du lait cru (en amont).

L. monocytogenes est fréquemment isolé dans les matières fécales des vaches laitières et largement répandu dans l'environnement (Husu, 1990 a et b ; Skoovgard, 1989). Seulement quelques cas de mammites à *Listeria* ont été

rapportés (WHO, 1988) et il semblerait que la contamination du lait à la ferme soit principalement liée à des problèmes d'hygiène. Ces observations indiquent soit que *L. monocytogenes* n'est pas particulièrement invasive soit que les cas de mammites à *Listeria* ne sont pas détectés en routine.

De nombreuses inconnues subsistent néanmoins sur l'écologie de *L. monocytogenes* dans les exploitations laitières. Ainsi, il est possible que certaines catégories de souches de *L. monocytogenes* trouvées dans le lait collecté à la ferme présentent des origines spécifiques ou des voies de contamination privilégiées qu'il est important de connaître dans la perspective d'une lutte qui commencerait à la ferme.

Les objectifs de notre étude sont alors de mieux comprendre l'épidémiologie de la contamination du lait à la ferme par *L. monocytogenes*, en précisant le rôle des facteurs liés à la conduite d'élevage et d'évaluer l'importance relative de la contamination due à une excrétion par voie mammaire par rapport à celle due aux sources d'environnement. Les résultats nous permettront de proposer une ou des stratégies de prévention adaptées aux exploitations laitières.

II - PLAN GENERAL DE L'ETUDE

Nous avons travaillé dans une zone de collecte destinée à la fabrication de fromage au lait cru regroupant plus de 2000 exploitations laitières. Dans une première partie de nos travaux, nous avons réalisé une enquête du type cas/témoins où nous avons testé des hypothèses de relation entre les conditions d'élevage et le risque de contamination du lait. Une exploitation cas est un élevage livrant du lait contaminé par *L. monocytogenes*. Alors qu'une exploitation témoin est un élevage où le lait de tank n'a jamais été trouvé contaminé par une espèce du genre *Listeria*.

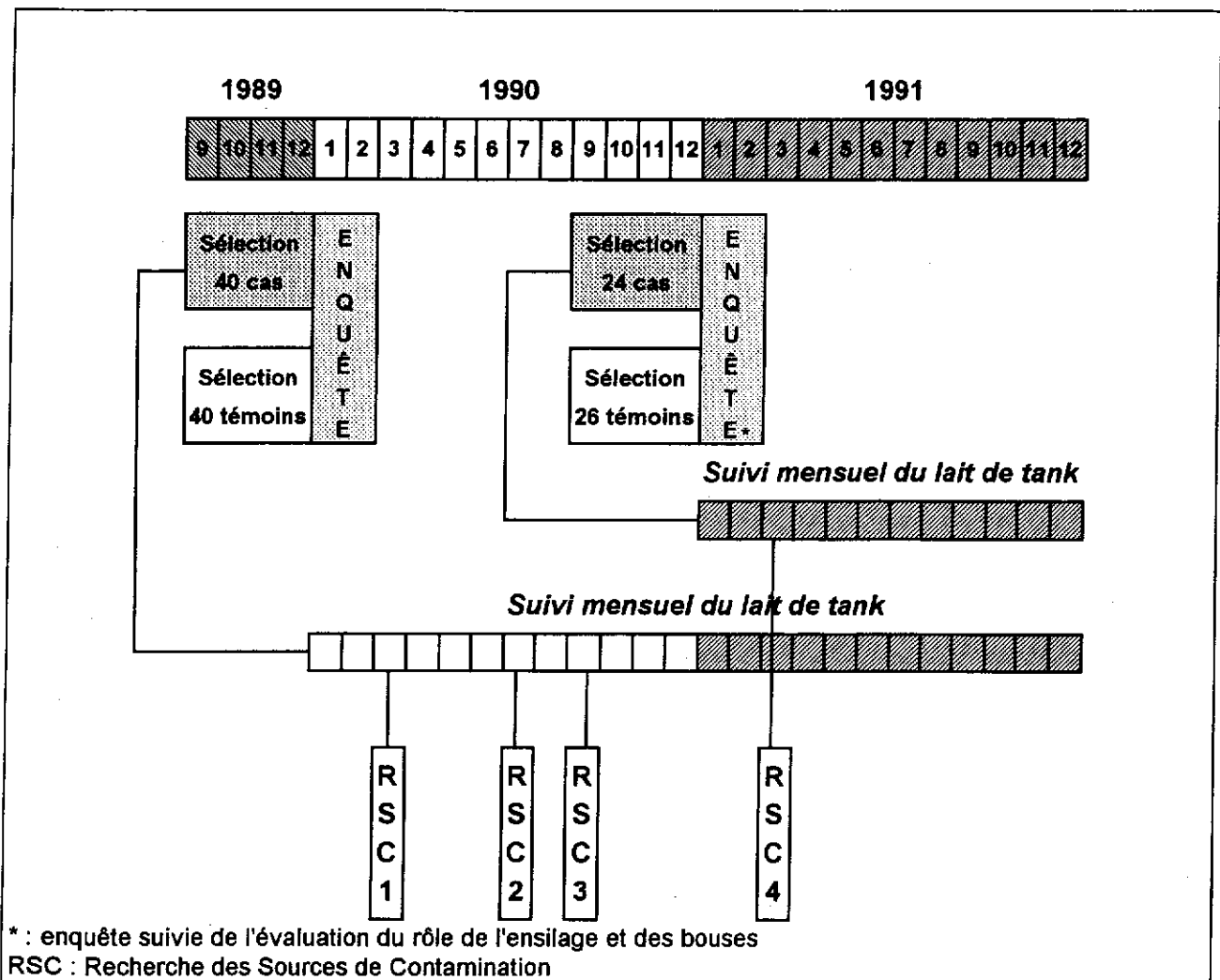
Par ailleurs nous avons évalué, dans une deuxième partie de notre étude, le rôle de la contamination de l'environnement sur le risque de contamination du lait de tank par *L.*

monocytogenes en recherchant la présence des *Listeria* dans des prélèvements d'ensilage et de matières fécales des vaches réalisés dans des exploitations cas et témoins.

La troisième partie de notre étude a consisté à suivre les élevages cas avec un rythme mensuel et ce durant les deux années de l'étude. Afin d'évaluer la part des origines intra et extramammaires nous avons entrepris dans certains de ces élevages la recherche de sources de contamination.

Les différentes étapes de l'étude (figure 1) sont les suivantes :

Figure 1 : Plan général de l'étude



A - SELECTION DES ELEVAGES

Les exploitations retenues dans notre étude sont situées dans une zone géographique regroupant des élevages collectés par des laiteries fabricant du fromage au lait cru.

La sélection des exploitations livrant du lait contaminé par *L. monocytogenes* (cas) s'est basée sur les résultats des contrôles effectués entre septembre et décembre 1989 (4 contrôles mensuels). Le choix des élevages témoins s'est basé aussi bien sur ces derniers contrôles que sur l'historique de la contamination de leur lait de tank par *L. monocytogenes*. Nous disposons des résultats des contrôles de la contamination depuis 1988.

Afin de compléter l'échantillon de notre étude, nous avons suivi le même protocole de sélection en 1990.

Au total, nous avons retenu 40 cas et 40 témoins en 1989 et 24 cas et 26 témoins en 1990.

B - ENQUETE CAS/TEMOINS

L'enquête a été réalisée en deux étapes, la première en 1990 et la deuxième en 1991.

Les facteurs d'élevage des cas ont été comparés avec ceux des élevages témoins. Les élevages témoins ont été tirés au sort parmi les élevages dont le lait n'est pas contaminé par une espèce du genre *Listeria*, tout en stratifiant sur les

facteurs suivants : le type de stabulation, le niveau de production laitière et la taille des troupeaux. Les relations entre ces trois facteurs et la contamination du lait collecté à la ferme par *L. monocytogenes* sont testées en comparant les 40 premiers élevages cas sélectionnés en 1989 à un échantillon représentatif de 80 exploitations témoins tirées au sort des fichiers des laiteries.

C - ROLE DES ENSILAGES ET DES BOUSES

Des prélèvements de bouse et d'ensilage des élevages cas et témoins sélectionnés en 1990 ont été mis en culture pour rechercher *L. monocytogenes*.

D - SUIVI MENSUEL DE LA CONTAMINATION

Les élevages cas sélectionnés dans notre étude sont contrôlés avec un rythme mensuel. Des échantillons de lait sont analysés tous les mois et les souches de *L. monocytogenes* isolées sont

caractérisées par les techniques de sérotypie et de lysotypie.

E - RECHERCHE DES SOURCES DE CONTAMINATION

Quatre séries de recherche des sources de contamination du lait par *L. monocytogenes* ont été entreprises dans des exploitations livrant du lait contaminé. Le choix des élevages où ces recherches ont été effectuées dépendait des résultats des suivis mensuels de la contamination du lait de tank. Nous exposerons successivement les principaux résultats concernant :

- Les facteurs d'élevage associés à la contamination du lait de tank par *L. monocytogenes*,
- Le rôle des ensilages et des bouses dans la contamination du lait de tank par *L. monocytogenes*,
- La recherche des sources de contamination dans les exploitations livrant du lait contenant *L. monocytogenes*.

III - FACTEURS D'ELEVAGE ASSOCIES A LA CONTAMINATION DU LAIT DE TANK PAR *L. MONOCYTOGENES*

Afin de mieux cerner les facteurs d'élevage favorisant la contamination du lait de tank par *L. monocytogenes*, une enquête épidémiologique a été mise en place dans 128 exploitations de vaches laitières. Notre but était d'identifier les principaux risques liés à la gestion du troupeau et de proposer une liste de points critiques qu'il faudrait maîtriser dans une perspective de lutte contre la contamination du lait par *L. monocytogenes* qui commencerait à la ferme.

D'une enquête préliminaire sur 120 exploitations laitières (40 cas et 80 témoins), il est ressorti que le risque de contamination du lait s'avère plus important dans les grands élevages en

stabulation libre que dans les petites exploitations en stabulation entravée (tableau I).

La présente enquête a été réalisée dans 64 élevages cas et 64 élevages témoins tirés au sort parmi la population des élevages non contaminés, après stratification sur la taille du troupeau, le niveau de production et le type de stabulation.

A partir des résultats "qualité du lait" mensuels de ces 128 élevages, nous avons constaté que la contamination en germes totaux et les numérations cellulaires ne sont pas significativement différentes entre les deux groupes d'élevages.

La liste des facteurs trouvés associés à la contamination du lait de tank par *L. monocytogenes* dans les élevages enquêtés est présentée dans le tableau II. A l'aide d'une régression logistique nous avons testé la relation de chacun de ces facteurs avec la contamination du lait conditionnellement à tous les autres facteurs étudiés. Le modèle retenu (tableau III) montre que la contamination du lait par *L. monocytogenes* est augmentée significativement (par un facteur multiplicatif variant de 3 à 6) lorsque les ensilages sont mal conservés (pH > 4), la propreté des animaux et l'entretien des

aires d'exercice sont insuffisants, et les conditions d'hygiène de traite ne sont pas bien respectées.

Malgré leur enchaînement, les trois catégories de facteurs étudiés (ensilage, logement et traite) restent significatifs dans le modèle final. Ce résultat conforte l'hypothèse d'existence de plusieurs sources potentielles de contamination du lait intervenant aux différents niveaux de la chaîne de contamination. Une prévention à la ferme ne serait alors efficace que si l'ensemble des risques liés à ces trois catégories de facteurs étaient maîtrisés.

Tableau I : Comparaison de la taille des troupeaux, du niveau de production du lait et du type de stabulation entre les cas et les témoins^a de l'étude préliminaire

<i>Variables</i>						
<i>Taille du troupeau</i>	N	Moyenne	s c	Min	Max	<i>Valeur - P</i>
cas	40	34	17	10	80	
"témoins" ^a	80	22	16	5	75	0.0003
<i>Niveau production^b</i>	N	Moyenne	s c	Min	Max	<i>Valeur - P</i>
cas	40	4240	1270	2000	7600	
"témoins" ^a	80	3600	1140	1600	7000	0.0070
<i>Type de stabulation</i>	Stabulation entravée		Stabulation libre		<i>Valeur - P</i>	
	N (%)		N (%)			
cas	13 (32,50)		27 (67,50)			
"témoins" ^a	53 (66,25)		27 (33,75)		<0.0001	

a : témoins choisis au hasard parmi les élevages livrant du lait non contaminé

b : niveau de production (kg/année/vache)

c : écart-type

Tableau II : Associations entre les variables et la contamination du lait
observées chez 64 cas et 64 témoins.

Description des variables	Cas ^a (N)	Témoins ^a (N)	O.R. ^b	I.C. 95% ^c	P
<u>Ensilage</u>					
<i>pH de la zone centrale du silo:</i>					
inférieur à 4	39	44			
supérieur à 4	23	9	2.88	1.21,6.90	.017
<i>pH de la zone périphérique du silo</i>					
inférieur à 4	9	27			
supérieur à 4	53	26	6.10	2.62,14.29	<10 ⁻⁴
<i>Chargement de la bêche</i>					
suffisant	29	39			
insuffisant	33	14	3.17	1.45,6.90	.004
<u>Logement</u>					
<i>Propreté des vaches</i>					
propres	8	29			
sales	56	35	5.81	2.49,13.5	<10 ⁻⁴
<i>Fréquence d'entretien de l'aire d'exercice</i>					
suffisante	15	41			
insuffisante	49	23	5.81	2.75,12.35	<10 ⁻⁵
<i>Surface de couchage/vache</i>					
suffisante	28	34			
insuffisante	13	6	2.63	0.90,7.69	.07
<u>Traite</u>					
<i>Eclairage suffisant du local de traite</i>					
oui	39	56			
non	25	8	4.48	1.90,10.6	.001
<i>Nettoyage du parc d'attente</i>					
suffisant	19	30			
insuffisant	45	34	2.10	1.01,4.31	.045
<i>Propreté du local de traite</i>					
suffisante	40	57			
insuffisante	24	7	4.88	2.01,11.9	<10 ⁻³
<i>Utilisation de lavettes individuelles</i>					
oui	20	32			
non	44	32	2.20	1.07,4.50	.031
<i>Désinfection des lavettes entre les traites</i>					
oui	32	43			
non	32	21	2.05	1.01,4.18	.048

a : nombre d'élevages dans chacune des modalités des variables

b : odds ratio

c : intervalle de confiance à 95% de l'O.R.

Tableau III : Modèle logistique retenu

Variable	b ^a	O.R. b	I.C. ^c 95 %	P
Type de stabulation	-1.1528	0.32	0.096,1.042	.0580
pH périphérique	1.7294	5.64	2.140,14.85	.0005
Propreté des animaux	1.7766	5.91	1.880,18.57	.0024
Entretien de l'aire d'exercice	1.3548	3.88	1.465,10.16	.0059
Eclairage	1.5197	4.57	1.454,14.37	.0093
Désinfection des lavettes	1.0750	2.93	1.093,7.859	.0326

a : paramètre du modèle logistique mesurant la relation entre le facteur et la contamination du lait.

b : O.R. = odds-ratio = exp(b)

c : Intervalle de confiance de l'odds-ratio à 95%

IV - ROLE DES ENSILAGES ET DES BOUSES DANS LA CONTAMINATION DU LAIT DE TANK PAR *LISTERIA MONOCYTOGENES*

L'objectif de cette partie de notre étude était d'évaluer la contamination de l'environnement par la présence de *L. monocytogenes* dans les ensilages et les matières fécales ainsi que de vérifier la pertinence de la mesure du pH de l'ensilage dans l'appréciation du risque de développement de *Listeria* dans l'ensilage.

L'évaluation de la contamination des bouses et des ensilages a été réalisée dans 24 élevages livrant du lait contaminé (cas) et 26 autres élevages dont le lait n'a jamais été trouvé contaminé par *Listeria* spp (témoins).

Nous avons prélevé deux échantillons d'ensilage par silo ; l'un représentatif de la zone périphérique et l'autre représentatif de la zone centrale. Nous avons également prélevé, dans chaque exploitation visitée, un échantillon composite de matière fécale de plusieurs vaches.

Les résultats de recherche des *Listeria* dans les ensilages ont permis de préciser la relation entre la qualité de conservation des ensilages et leur niveau de contamination. Parmi les critères caractérisant la qualité de conservation des ensilages, le pH est celui qui apparaît le plus lié à la consommation du fourrage. Lorsque le pH est strictement inférieur à 4, la présence de *L. monocytogenes* et/ou *L. innocua* est possible (44% des ensilages à pH < 4,0 étaient contaminés) mais avec des concentrations faibles

(< 1 U.F.C./g d'ensilage). A l'opposé, quand le pH est supérieur à 4, la présence de *L. monocytogenes* et/ou de *L. innocua* est plus fréquente (80% des ensilages à pH > 4,0 étaient contaminés) et avec des concentrations parfois très élevées (jusqu'à 10 millions d'U.F.C./g d'ensilage).

D'autre part, les ensilages contaminés par *Listeria* spp contenaient en moyenne plus d'acide butyrique que les ensilages non contaminés.

L. innocua et *L. monocytogenes* sont isolés dans les bouses et dans les ensilages aussi bien chez les cas que chez les témoins. Le tableau IV présente les relations entre la contamination des bouses et des ensilages avec celle du lait de tank observée chez 24 cas et 26 témoins.

La contamination des bouses par *L. monocytogenes* augmenterait le risque de contamination du lait de tank par 9,4 ($p = 0,001$). Nous observons aussi le même type de relation entre la contamination de la zone périphérique de l'ensilage et celle du lait de tank (O.R. = 4,7 ; $p = 0,04$, test exact de Fisher). En associant ces deux facteurs contamination des bouses et/ou de l'ensilage (zone périphérique ou centrale) par *L. monocytogenes*, nous observons une forte relation avec la contamination du lait (O.R. = 20,8 ; $p = 0,0001$). Toutefois, il existe des élevages dont l'environnement est contaminé sans

répercussion sur le lait de tank. Nous avons alors comparé les conditions d'hygiène entre ce groupe et les élevages cas dont l'ensilage et/ou les bouses sont contaminés. En raison de la faible taille de cet échantillon, nous n'avons pas mis en évidence l'ensemble des associations trouvées lors de l'enquête réalisée chez les 64 cas et les 64 témoins. Néanmoins, la présence de vaches sales dans le troupeau et la fréquence de nettoyage et d'entretien du bâtiment augmenteraient très significativement le risque de

contamination du lait, les O.R. étant respectivement de 55,6 ($p < 10^{-4}$) et de 11,5 ($p = 0,02$).

Nous avons par ailleurs comparé les 5 dernières numérations des spores butyriques dans le lait de tank des 24 fermes cas et 26 témoins. Ces résultats sont résumés dans le tableau V. L'analyse de variance multidimensionnelle ne montre pas de différence entre les deux groupes, cas et témoins.

Tableau IV : Relations entre les contaminations des bouses et des ensilages avec celle du lait de tank (nombre d'élevages) O.R. = Odds-Ratio, N.S. = non significatif à $\alpha=0,10$

		Cas (24)	Témoins (26)	O.R.
Bouses	<i>L. innocua</i>	75%	58%	2,2 (N.S.)
	<i>L. monocytogenes</i>	83%	35%	9,4 $p = 0,001$
Ensilage Centre	<i>L. innocua</i>	45%	29%	1,96 (N.S.)
	<i>L. monocytogenes</i>	30%	18%	2 (N.S.)
Ensilage Périphérie	<i>L. innocua</i>	60%	59%	1,0 (N.S.)
	<i>L. monocytogenes</i>	50%	18%	4,7 $p = 0,04^*$
<i>Listeria monocytogenes</i> dans les bouses et/ou dans les ensilages		92%	35%	20,8 $p = 0,0001$

* : test exact de Fisher

Tableau V : Résultats des cinq dernières numérations des spores butyriques, chez les 24 exploitations cas et 26 témoins (résultats exprimés en unité logarithmique base 10)

Mois (année)	cas		témoins	
	moyenne	écart-type	moyenne	écart-type
Octobre (1990)	3,0126	0,4979	2,7693	0,5254
Novembre (1990)	3,0858	0,6758	2,9629	0,4209
Décembre (1990)	3,2026	0,4580	3,1954	0,4952
Janvier (1991)	3,3756	0,5595	3,2958	0,4483
Février (1991)	3,2044	0,6401	3,2715	0,4334

V - RECHERCHE DES SOURCES DE CONTAMINATION DANS LES EXPLOITATIONS LIVRANT DU LAIT CONTENANT *LISTERIA MONOCYTOGENES*

L'objectif de cette troisième partie de notre étude était d'évaluer le rôle des origines intramammaire et extramammaire dans la contamination du lait à la ferme.

A - SOURCES DE CONTAMINATION

La recherche des origines et des voies de contamination a porté sur 33 élevages livrant du lait contaminé par *L. monocytogenes*.

L. monocytogenes et les autres espèces de *Listeria spp* ont été recherchées dans le lait de l'ensemble des vaches en lactation, l'ensilage, les bouses, la peau des trayons et les eaux récupérées des installations de traite. Grâce à l'utilisation des techniques de sérotypie et de lysotypie, nous étions capables dans cette étude de comparer les souches isolées des laits de tank avec celles retrouvées dans les éventuelles sources de contamination. Si la technique de sérotypie souffre d'un faible pouvoir discriminant, la lysotypie malgré parfois un pourcentage élevé de souches non typables (Audurier et Martin, 1989) peut détecter plus d'hétérogénéité entre les souches de *L. monocytogenes*. La lysotypie donne une plus grande signification à l'identification des mêmes souches dans le lait de tank et les éventuelles sources de contamination.

Au total, 1286 colonies de *L. monocytogenes* isolées à partir de 3.400 échantillons d'origines diverses (lait de tank, lait de vache, peau des trayons, bouses, ensilages, eaux) ont été typées. La proportion des souches lysotypables étaient de 81 % pour le séro groupe 4 et de 71 % pour le séro groupe 1/2.

A l'aide de la règle d'interprétation proposée par Mc Lauchlin et al. (1986), nous avons recensé 100 lysovars non distinguables appartenant au séro groupe 1/2 et 21 lysovars non distinguables appartenant au séro groupe 4. Les résultats montrent la grande diversité des souches isolées, non seulement sur l'ensemble, mais aussi sur les prélèvements effectués dans le même élevage : le nombre moyen de souches non distinguables isolées dans un même élevage était de l'ordre de 7 par élevage. L'étude comparative entre les souches isolées à partir du lait de tank et des

diverses sources potentielles de contamination a montré au moins une correspondance entre ces souches dans 13 élevages parmi les 33 étudiés. L'absence de correspondance dans certains élevages peut être expliquée soit par les limites des techniques de typage utilisées (souches non typables) soit par les limites de notre protocole de recherche des sources de contamination. En effet, 39% des souches *L. monocytogenes* isolées sont non typables et nos recherches ont été effectuées dans certains cas soit dans des élevages où les éleveurs ont changé leur comportement, notamment en améliorant l'hygiène générale du troupeau, soit tardivement après disparition des sources de contamination.

En recoupant l'ensemble des informations disponibles (résultats bactériologiques et de typage des souches) nous avons distingué deux voies de contamination : la voie intramammaire et la voie extramammaire.

1. VOIE INTRAMAMMAIRE

La contamination par la voie mammaire est peu fréquente. Elle concerne dans notre étude 3 élevages présentant chacun une vache atteinte d'une mammité à *L. monocytogenes* sur un seul quartier. Le lait de ces trois vaches était d'apparence normale avec un niveau de contamination compris entre 10^3 et 60.10^3 *L. monocytogenes/ml* de lait. Les numérations cellulaires élevées, entre 10^6 et 4.10^6 cellules/ml de lait, avec l'absence de signes cliniques locaux et généraux présentent les caractéristiques des mammites subcliniques.

La présence de *L. monocytogenes* dans le lait de tank peut résulter d'un seul animal excréteur (voir un seul quartier de la mamelle).

L'excrétion par la voie mammaire serait durable et donc responsable des contaminations sur plusieurs mois (tant que la vache est en production) du lait de tank avec parfois des niveaux élevés, supérieurs à 5 *L. monocytogenes/ml* de lait de tank.

L'examen *post mortem* des deux vaches abattues a montré que l'infection par *L. monocytogenes* ne s'est pas généralisée, mais elle ne s'est pas seulement limitée à la mamelle. En effet, les ganglions rétro-mammaires situés du même côté que le quartier atteint étaient infectés ainsi que le ganglion iliaque d'une de ces deux vaches.

Ces résultats montrent que la voie d'infection peut être ascendante et que l'excrétion intermittente de *L. monocytogenes* dans le lait n'est pas à exclure, même après administration intramammaire d'antibiotique conduisant à une guérison locale.

2. VOIE EXTRAMAMMAIRE

La voie extramammaire est plus fréquente que la voie intramammaire. Elle concerne effectivement 31 élevages sur les 33 étudiés.

La contamination du lait est plus irrégulière et de plus faible niveau que dans les élevages avec origine intramammaire. Cependant, *L. innocua* est plus souvent isolé dans les élevages avec des origines extramammaires que dans les élevages avec une origine intramammaire.

Les sources potentielles de contamination du lait sont diverses : la peau des trayons, les bouses, les ensilages et les installations de traite. L'étude des correspondances entre les souches isolées à partir du lait de tank et celles des sources potentielles de contamination montre que les principales origines de contamination du lait sont la peau des trayons et les bouses.

L'examen des frottis des trayons a révélé un fort taux d'isolement de *L. innocua* et de *L. monocytogenes* (respectivement 83,5 % et 48 %)

Les trayons des vaches sont fréquemment souillés par les matières fécales ou les litières. Des correspondances entre les souches de *L. monocytogenes* isolées à partir de la peau des trayons et des bouses ont été observées dans 8 exploitations différentes. Les pourcentages d'isolement de *Listeria* spp et de *L. monocytogenes* à partir des matières fécales sont respectivement de 81 % (107/132) et 38,5 % (50/132).

Listeria spp et *L. monocytogenes* ont été isolés dans respectivement 62% et 39% des ensilages analysés.

L'étude comparative (élevage par élevage) des souches de *L. monocytogenes* isolées à partir des ensilages, des bouses et des frottis des trayons nous a permis d'observer des correspondances entre les souches des ensilages et des bouses dans 4 exploitations et entre les souches des ensilages et des frottis des trayons dans 6 exploitations.

Ces résultats montrent que l'ensilage pourrait être considéré comme une source primaire de *Listeria* dans les exploitations laitières.

Des imperfections dans l'application du protocole de nettoyage des installations de traite ont été observées dans la plupart des élevages (15/33). *Listeria* spp a pu être isolé 16 fois à partir des eaux résiduelles récupérées des installations avant la traite ou des eaux de rinçage à l'eau stérile après le nettoyage habituel des installations (après la traite). Ces observations témoignent de l'importance des mesures de désinfection des installations dans les élevages livrant du lait contaminé.

B - REPARTITION DES SEROGROUPES

La répartition des sérogroupes dans l'environnement des exploitations laitières permet de constater que le sérotype 4, le plus fréquemment isolé dans les cas de listériose humaine et animale, est rarement isolé dans l'environnement des vaches, et ce contrairement au sérotype 1/2.

Malgré l'importance épidémiologique des *L. monocytogenes* du sérotype 4b, les efforts de maîtrise de la contamination des aliments ne devraient pas être uniquement ciblés sur ce sérotype.

L'absence de *L. monocytogenes* du sérotype 4 dans les ensilages nous laisse penser que le sérotype 4 et le sérotype 1/2 auraient des voies de contamination différentes.

L'origine des souches du sérotype 4 ne serait pas alimentaire et la contamination du lait de tank par ce même sérovar serait plutôt d'origine intramammaire.

La faible fréquence d'isolement des souches du sérotype 4 à partir des frottis des trayons et des bouses et leur absence des ensilages rendent difficile la détermination de l'origine des sérovars

4 contaminant les mamelles. Le portage avec implantation de *L. monocytogenes* dans la glande mammaire est possible, comme en témoignent nos observations concernant les cas de mammite à *Listeria* où nous avons montré en particulier la présence de *L. monocytogenes* du sérotype 4 dans les noeuds lymphatiques de drainage.

En revanche, les souches du sérotype 1/2 seraient surtout d'origine alimentaire (ensilage) et contamineraient le lait par l'intermédiaire des bouses ou de la peau des trayons si le niveau d'hygiène dans l'exploitation n'est pas suffisant.

Cependant, *L. monocytogenes* du sérotype 1/2 peut être aussi à l'origine de mammite chez la vache laitière. Les trois cas de mammite rapportés dans la littérature (Fedio et al. 1990 ; Sharp 1989 ; Gitter et al. 1980 et Jensen et Larsen 1973) et par nous même mettaient en cause les deux sérotypes de *L.*

monocytogenes. Les deux sérotypes doivent être considérés a priori pathogènes et pouvant entraîner dans certaines circonstances la maladie chez l'animal.

C - VIRULENCE DES SOUCHES

La virulence des souches a été étudiée sur un modèle murin utilisant des animaux immunodéprimés à la carraghénane (Stelma et al., 1987). Ce modèle a été validé par Tabouret et al. (1991) et Del Corral et al. (1990).

Parmi les 158 souches testées, 3 appartenant au sérotype 1/2 ne sont pas virulentes. En tenant compte des modalités d'échantillonnage nous estimons la proportion des souches de *L. monocytogenes* virulentes à 100% pour le sérotype 4 et à 97% pour le sérotype 1/2.

VI - PREVENTION DE LA CONTAMINATION DU LAIT DESTINE AUX FABRICATIONS "LAIT CRU"

Afin de garantir la salubrité de la matière première, les entreprises laitières fabriquant des produits sensibles à la contamination par *L. monocytogenes* mettent de plus en plus en oeuvre des protocoles de surveillance de la contamination des laits de tank. Il s'agit, grâce à la réalisation d'analyses sur des échantillons prélevés tous les mois, de s'assurer que les élevages sont à même de livrer un lait non contaminé. Lorsque dans un élevage un des contrôles révèle une contamination par *L. monocytogenes* son lait est exclu de la collecte destinée aux fabrications au lait cru, et est utilisé pour les produits pasteurisés. L'enjeu est alors de mettre en oeuvre des interventions dans les élevages livrant du lait contaminé afin qu'ils puissent réintégrer le plus rapidement possible la collecte "lait cru".

Dans les zones de collecte destinées aux fabrications au lait cru nous pouvons proposer dans le cadre d'un programme de lutte contre la contamination du lait à la ferme la démarche suivante :

1. Mise en place d'un plan de surveillance de la contamination des laits à la ferme (contrôles mensuels).

2. Des interventions dans les élevages livrant du lait contaminé faisant appel soit à des vétérinaires praticiens soit à des agents techniques formés à la qualité en élevage.

L'intervention dans ces élevages nécessite dans un premier temps et dans chaque ferme l'analyse des points critiques mis en évidence dans notre étude. Suite à cet état des lieux, on proposera à l'éleveur un plan d'amélioration des pratiques d'élevage et/ou un plan de recherche d'une ou des éventuelles sources intramammaires.

Afin d'assurer la qualité de son produit, l'éleveur devrait être capable de maîtriser lors de la production du lait les points critiques suivants :

A - MAMMITES A LISTERIA CCP1

La production laitière est un point critique de la contamination du lait de tank par *L. monocytogenes*, comme en témoignent l'existence de mammites clinique ou subclinique et la présence de *L. monocytogenes* dans les noeuds lymphatiques de drainage de la mamelle. Le traitement d'une mammite à *Listeria* ne

garantit pas la guérison bactériologique et l'excrétion intermittente de *L. monocytogenes* reste possible même après une guérison locale.

La confirmation de l'existence d'une source intramammaire (cas de mammite à *Listeria*) nécessite des prélèvements aseptiques de lait de quartier. Afin de limiter les coûts de repérage des cas de mammite à *Listeria*, on ne prélèvera que les vaches présentant des numérations cellulaires anormales (>300.000 / ml). Les *L. monocytogenes* peuvent être isolés en isolement direct aussi bien sur gélose au sang que sur milieu PALCAM.

Lorsqu'une vache est repérée et confirmée atteinte d'une mammite à *Listeria*, l'éleveur doit envisager sa réforme dans les meilleurs délais. Si l'origine de la contamination est exclusivement intramammaire le lait de tank deviendra non contaminé suite à la réforme de la vache en cause.

La détection des cas de mammite à *Listeria* par les méthodes bactériologiques étant beaucoup trop longue, très coûteuse et nécessitant des prélèvements faits dans des conditions aseptiques, de nouvelles méthodes simples, rapides, spécifiques et économiques sont alors à développer.

Concernant la prévention des cas de mammite à *Listeria*, nous ne pouvons pas actuellement proposer de mesures spécifiques. Les souches de *L. monocytogenes* de sérogroupe 1/2 sont fréquemment isolées dans l'environnement des exploitations laitières. Des mesures destinées à réduire les niveaux de contamination de l'environnement (bouses et ensilage) et à améliorer l'hygiène de traite devraient alors contribuer à réduire le risque des mammites attribuables aux souches du sérogroupe 1/2. A l'inverse, l'origine des souches appartenant au sérogroupe 4 responsables des cas de mammite reste inconnue.

B - LA TRAITE : CCP2

C'est au moment de la traite que la grande majorité des contaminations des laits par *L. monocytogenes* ou les autres espèces de *Listeria* spp se produisent (contaminations extramammaires).

La propreté des animaux, en particulier celle des mamelles et une bonne hygiène de traite sont indispensables.

C - PROPRETE DES ANIMAUX : CCP2₁

La propreté des animaux est l'un des facteurs à maîtriser dans la lutte contre la contamination du lait de tank.

La contamination superficielle des trayons par *Listeria* spp est assez fréquente et est liée à la propreté des animaux et aux conditions de logement des animaux (conception et entretien des bâtiments).

L'origine des souches de *Listeria* spp contaminant la peau des trayons serait essentiellement les bouses.

D - BOUSES : CCP2₂

Les bouses peuvent être considérées comme un point critique de la contamination du lait dans les exploitations où l'hygiène de traite est défectueuse. En effet, les bouses peuvent contaminer le lait soit directement par passage accidentel lors de la traite soit indirectement par l'intermédiaire des trayons contaminés et mal lavés avant la traite.

E - ENSILAGE : CCP2₃

L'origine de la contamination des bouses est essentiellement alimentaire. Parmi les aliments, les ensilages occupent une place particulière. La fréquence d'isolement des *Listeria* spp est plus élevée lors de mauvaise qualité. L'association ensilage contaminé et présence de *L. monocytogenes* dans le lait de tank a été montrée dans notre étude. Les ensilages doivent faire alors l'objet de précautions particulières au cours de la confection des silos, de leur conservation et de leur distribution.

F - HYGIENE DE TRAITE : CCP2₄

L'entretien des accès, la propreté et l'éclairage de la salle de traite devraient être maîtrisés. L'utilisation des lavettes individuelles, le nettoyage et l'essuyage des trayons avant la

traite semblent limiter les risques de passage des *Listeria spp* dans le lait.

Le nettoyage et la désinfection des lavettes et des équipements devraient être effectués entre les traites.

Les interventions dans les élevages livrant du lait contaminé sont indispensables mais ne seront certainement pas suffisantes. En effet, notre étude montre qu'il existe deux catégories d'élevages à risque ne livrant pas de lait contaminé :

- Des élevages ayant un environnement contaminé (ensilages et/ou bouses) mais qui maîtrisent parfaitement la contamination du

lait par l'application de mesures d'hygiène rigoureuses. Ces élevages risquent d'avoir un lait contaminé si les conditions d'hygiène se dégradent.

- Des élevages qui ne respectent pas les règles d'hygiène de base mais leur environnement n'est pas contaminé. Si l'environnement devient contaminé (ensilages mal conservés ou introduction d'animaux excréteurs par les bouses), le lait risque alors de l'être.

Il est alors nécessaire d'élargir les actions sur l'hygiène générale des exploitations à l'ensemble des élevages afin de prévenir l'apparition de nouveaux élevages contaminés.

*
* *

En conclusion, l'objectif d'une absence totale de *L. monocytogenes* dans l'environnement des exploitations laitières paraît utopique. Les mesures de lutte proposées à l'échelon des élevages devraient cependant permettre de réduire significativement les risques de contamination des produits laitiers, en particulier ceux fabriqués à base de lait cru.

VII - REFERENCES

- AUDURIER A. and MARTIN C.- Phage typing of *Listeria monocytogenes*. int. J. Food Microbiol., 1985, 251 - 257.
- BILLE J.- Epidemiology of human listeriosis in Europe, with special reference to the Swiss outbreak. p. 71-74. In A.J. Miller, J.L. Smith, and G.A. Somkuti (ed.). Foodborne listeriosis. Society for Industrial Microbiology. Elsevier Science Publishing. Inc., 1990, New York.
- DEL CORRAL F.D., BUCHANAN R.L., BENCIVENGO M.M. and COOKE P.H.- Quantitative comparison of selected virulence associated characteristics in food and clinical isolates of *Listeria*. J. Food Prot., 1990, 53, 1003 - 1009.
- FEDIO W.M., SCHOONDERWOERD M., SCHUTE R. and JACKSON H.- A case of bovine mastitis caused by *Listeria monocytogenes*. Can. Vet. J., 1990, 31, 773-775.
- FLEMING D.W., COCHI S.L., Mc. DONALD K.L., BRONDUM J., HAYES P.S., PLIKAYTIS B.D., HOLMES M.B., AUDURIER A., BROOME C.V. and REINGOLD A.L.- Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. New Engl. J. Med., 1985, 312, 404 - 407.
- GITTER M., BRADLEY R. and BLAMPIED P.H.- *Listeria monocytogenes* infection in bovine mastitis. Vet. Record., 1980, 107, 390-393.
- HUSU J.R.- Epidemiological studies on the occurrence of *Listeria monocytogenes* in the feces of dairy cattle. J. Vet. Med., 1990, B 37, 276 - 282.
- HUSU J.R., SEPPÄNEN J.T., SIVELÄ S.K. and RAURAMAA A.L.- Contamination of raw milk by *Listeria monocytogenes* on Dairy Farms. J. Vet. Med., 1990, B 37, 268 - 275.

- JENSEN J. and LARSEN H.E.- *Listeria monocytogenes* som arsaag til 3 tilfaelde af mastitis hos kvaeg. Nord Vet. Med., 1973, **25**, 322-329.
- LINNAN M.J., MASCOLA L., LOU X.D., GOULET V., MAY S., SALMINEN C., BIRD D.W., YONCKURA M.L., HAYES P., WEAVER R., AUDURIER A., PLIKAYTIS B.D., FANNIN S.L., KLEKS A. and BROOME C.V.- Epidemic listeriosis associated with mexican style cheese. N. Engl. J. Med., 1988, **319**, 823-828.
- MCLAUCHLIN J.- Human listeriosis in Britain, 1967-85, a summary of 722 cases. 2. Listeriosis in non-pregnant individuals, a changing pattern of infection and seasonal incidence. Epidemiol. Infect., 1990b, **104**, 191-201.
- MCLAUCHLIN J.- Epidemiology of listeriosis in Britain. In : Asept (ed.), *Listeria* and food safety, 13-14 juin 1991. Laval. , 28-47.
- PINNER R.W., SCHUCHART A., SWAMINATHAN B., HAYES P.S., DEEVER K.A., WEAVER R.E., PLIKAYTIS B.D., REEVES M., BROOME C.V., WENGER J.D. and the *Listeria* study Groups.- Role of foods in sporadic listeriosis. II Microbiologic and epidemiologic investigation. JAMA., 1992, **267**, 2046-2050.
- SANAA M.- Epidémiologie de la contamination du lait à la ferme par *Listeria monocytogenes*. Thèse Doctorat Univ. Paris XI, 1993, 207 pages.
- SANAA M., POUTREL B., MENARD J.L. and SERIEYS F.- Risk factors associated with contamination of raw milk by *Listeria monocytogenes* in dairy farms. J Dairy Sci., 1993, **76**, 2891.
- SCHLECH W.F., LAVIGNE P.M., BORTOLUSSI R.A., ALLEN A.C., HALDANE E.V., WORT A.J., HIGHTOWER A.W., JOHNSON S.E., KING S.H., NICHOLLS E.S. and BROOME C.V.- Epidemic listeriosis - Evidence for transmission by food New. Engl. J. Med., 1983, **308**, 203 - 206.
- SCHUCHART A. , DEEVER K.A., WENGER J.D., PLIKAYTIS B.D., MASCOLA L., PINNER R.W., REINGOLD A.L., BROOME C.V. and the *Listeria* study Groups.- Role of foods in sporadic listeriosis. I Case-contro study of dietary risk factors. JAMA., 1992 , **267**, 2041-2045.
- SHARP M.W.- Bovine mastitis and *Listeria monocytogenes* . Vet. Record., 1989, 512-513.
- SKOVGAARD N.- *Listeria* : ecology in the food chain. Acta Microbiol Hung, 1989, **36**, 239-243.
- STELMA G.N. , REYES A.L., PEELER J.T., FRANCIS D.W., HUNT J.M., SPAULDING P.L., LOVETT J.- Pathogenecity test for testing *Listeria monocytogenes* using immunocompromised mice. J. Clin. Microbiol., 1987, **25**, 2085-2089.
- TABOURET M., DERYCKE J., AUDURIER A. and POUTREL B.- Pathogenicity of *Listeria monocytogenes* isolates in immunocompromised mice in relation to listeriolysin production. J. Med. Microbiol., 1991, **34**, 13-18.
- WHO Working Group.- Foodborne listeriosis. Bull. W.H.O., 1988, **66**, 421-428.

*
* *