

***Listeria monocytogenes***  
**en abattage et découpe de porc :**  
**contrôle de la contamination environnementale**  
**des frigos de ressuage et salles de découpe**

---

Thèse pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

Diplôme d'Etat

*Présentée et soutenue publiquement en 2003*  
*devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*  
par

**Roxane, Françoise, Claude ROSSEL**

Née le 27 juin 1970 à Toulouse (Haute-Garonne)

---

**Directeur de thèse : Monsieur le Docteur Hubert BRUGERE**

---

**JURY**

PRESIDENT :

**M. DABERNAT**

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :

**M. BRUGERE**

Maître de Conférence à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

**M. DARRE**

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

## Liste Récapitulative des enseignants



## Remerciements

A Monsieur le Professeur Henri DABERNAT  
Professeur des Universités  
Praticien hospitalier  
Bactériologie – Virologie

qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre thèse,

Hommages respectueux

A Monsieur le Docteur Hubert BRUGERE  
Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse  
Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale

qui nous a fait l'honneur d'accepter d'être rapporteur de ce travail,

Sincère reconnaissance

A Monsieur le Professeur Roland DARRE  
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse  
Productions Animales

qui nous a fait l'honneur d'être membre de notre jury de thèse,

Sincères remerciements

A ma maman  
« chérie, adorée de mon cœur »,

A mon père,  
qui aurait tant aimé tenir ce mémoire entre les mains.  
Ce cadeau arrive malheureusement trop tard.

A toute ma famille,  
pour avoir été là,

A tous mes amis,

A Christophe,  
pour tout l'amour qu'il me donne ainsi que pour sa patience,

A mes deux « fillottes » adorées Jeanne et Rose.

## Tables des matières

Liste Récapitulative des enseignants .....	2
Remerciements .....	4
Tables des matières .....	7
Table des illustrations .....	12
Lexique .....	15
<b>INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>16</b>
<b>PARTIE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>18</b>
<b>Chapitre I : Caractéristiques générales des <i>Listeria</i> .....</b>	<b>19</b>
1. Taxonomie .....	19
2. Caractéristiques phénotypiques .....	19
2.1. Caractéristiques morphologiques et structurales .....	19
2.2. Caractéristiques biochimiques et métaboliques .....	19
3. Caractérisation infra-spécifique .....	21
3.1. Typage phénotypique .....	21
3.1.1. Sérotypie .....	21
3.1.2. Lysotypie .....	22
3.1.3. Electrophorèse d'isoenzymes .....	22
3.2. Typages génotypiques de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	22
3.2.1. Marqueurs liés à l'ADN plasmidique .....	22
3.2.2. Marqueurs liés à l'ADN chromosomique .....	22
3.2.2.1. Polymorphisme de l'ADN chromosomique révélé par restriction - Analyse RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) du chromosome .....	23
3.2.2.2. Polymorphisme de l'ADN révélé par amplification .....	24
3.2.3. Marqueurs liés aux gènes .....	25
3.2.3.1. Polymorphisme révélé par restriction .....	25
3.2.3.2. Polymorphisme révélé par amplification .....	25
3.2.4. Critères d'évaluation des différentes méthodes de typage bactérien ....	25

<b>4. Physiologie</b> .....	<b>26</b>
4.1. Température .....	26
4.2. Acidité, pH.....	27
4.3. Taux de sel .....	27
4.4. $A_w$ .....	27
4.5. Facteurs de destruction des <i>Listeria</i> .....	28
4.5.1. Température .....	28
4.5.2. Hautes pressions .....	28
4.5.3. Irradiations.....	28
4.5.4. Désinfectants .....	28
<b>5. Méthodes d'analyses</b> .....	<b>29</b>
5.1. Méthodes de recherche .....	29
5.2. Méthodes de dénombrement .....	29
5.3. Méthodes alternatives .....	30
5.4. Isolement et Identification .....	31
5.5. Problèmes liés à l'échantillon.....	32
<b>Chapitre II : Les listérioses animales et humaines</b> .....	<b>33</b>
<b>1. Listérioses animales</b> .....	<b>33</b>
1.1. Espèces infectées.....	33
1.2. Tableaux cliniques .....	33
1.3. Eléments d'épidémiologie des listérioses animales .....	35
1.3.1. Prévalence de la maladie .....	35
1.3.2. Portage sain .....	35
<b>2. Listérioses humaines</b> .....	<b>37</b>
2.1. Physiopathologie.....	37
2.1.1. Les étapes de l'infection .....	37
2.1.1.1. Voie d'entrée.....	37
2.1.1.2. Localisation au système réticulo-endothélial.....	37
2.1.1.3. Atteinte des organes cibles.....	37
2.1.2. Réaction immunitaire .....	37
2.1.2.1. Nature de la réponse .....	37
2.1.2.2. Influence du statut immunitaire .....	38
2.1.3. Relation dose-réponse.....	38
2.2. Tableaux cliniques .....	39
2.2.1. La listériose materno-néonatale .....	39
2.2.1.1. La listériose de la femme enceinte .....	39
2.2.1.2. La listériose néonatale précoce .....	39
2.2.1.3. La listériose néonatale tardive .....	40
2.2.2. Les listérioses de l'enfant et de l'adulte .....	40
2.2.2.1. Les listérioses invasives .....	40
2.2.2.2. Les listérioses non invasives .....	40
2.3. Traitement.....	40
2.4. Eléments d'épidémiologie des listérioses humaines .....	41
2.4.1. Sources de contamination .....	41

2.4.1.1. Aliments incriminés dans les épidémies de listérioses .....	41
2.4.1.2. Aliments à risque .....	41
2.4.2. Prévalence de la maladie .....	44
2.4.2.1. Généralités .....	44
2.4.2.2. Evolution des cas en France.....	45
2.4.3. Sérotypes impliqués .....	46
2.4.4. Portage sain .....	46
<b>Chapitre III : <i>Listeria monocytogenes</i> dans la filière porcine .....</b>	<b>48</b>
<b>1. Généralités.....</b>	<b>48</b>
<b>2. Etapes de l'abattage, du ressuage et de la découpe de porc.....</b>	<b>48</b>
2.1. L'abattage des porcs.....	48
2.1.1. Transport et stabulation .....	48
2.1.2. Préparation externe des carcasses .....	48
2.1.2.1. Anesthésie et saignée.....	48
2.1.2.2. Echaudage.....	50
2.1.2.3. Epilage.....	50
2.1.2.4. Flambage-polissage .....	50
2.1.3. Habillage des carcasses.....	50
2.1.4. Réfrigération .....	51
2.2. La découpe de porc .....	52
<b>3. Evolution de la contamination en <i>Listeria monocytogenes</i> en abattage et découpe de porc .....</b>	<b>52</b>
3.1. Animaux vivants .....	52
3.2. A l'abattoir .....	53
3.3. En découpe.....	54
3.4. Sources de contamination : Rôle de l'environnement industriel.....	54
3.5. Sérotypes isolés.....	55
<b>Chapitre IV : Réglementation .....</b>	<b>56</b>
<b>1. Bases épidémiologiques .....</b>	<b>56</b>
<b>2. Réglementation française.....</b>	<b>56</b>
<b>3. Contrôles réalisés .....</b>	<b>58</b>
3.1. Auto-contrôles des industriels .....	58
3.2. Contrôles à la distribution de la DGCCRF.....	58

## Partie II : PRESENTATION DES RESULTATS .....59

<b>1. Protocole technique.....</b>	<b>60</b>
1.1. Sites industriels : nombre et caractéristiques.....	60
1.2. Locaux prélevés.....	60
1.3. Prélèvements et analyses réalisés.....	60
1.3.1. Dénombrement et recherche de <i>Listeria monocytogenes</i> et des autres espèces de <i>Listeria</i> .....	61
1.3.1.1. Prélèvement.....	61
1.3.1.2. Analyses réalisées.....	61
1.3.2. Dénombrement semi-quantitatif de la Flore Mésophile Totale à 30°C...	62
1.3.2.1. Prélèvement.....	62
1.3.2.2. Analyse et interprétation.....	62
1.3.3. Mesure de l'ATP.....	63
1.3.3.1. Rappel sur le principe.....	63
1.3.3.2. Prélèvements et Analyses.....	65
1.4. Sites de prélèvements.....	66
1.4.1. Nature des sites.....	66
1.4.2. Nombre de sites prélevés.....	67
1.5. Nombre de répétitions.....	67
1.6. Le nettoyage-désinfection approfondi.....	68
<b>2. Résultats.....</b>	<b>70</b>
2.1. Résultats généraux <i>Listeria monocytogenes</i> et autres espèces.....	70
2.2. Détails des résultats <i>Listeria monocytogenes</i> par atelier.....	71
2.2.1. En salle de découpe.....	71
2.2.1.1. Ensemble des ateliers.....	71
2.2.1.2. Ateliers faiblement contaminés.....	72
2.2.1.3. Ateliers fortement contaminés.....	72
2.2.1.4. Efficacité du nettoyage-désinfection approfondi.....	74
2.2.2. En frigo de ressuage.....	75
2.2.2.1. Ensemble des ateliers.....	75
2.2.2.2. Ateliers faiblement contaminés.....	76
2.2.2.3. Ateliers fortement contaminés.....	77
2.2.2.4. Efficacité du nettoyage-désinfection approfondi.....	78
2.2.2.5. Résultats selon les types de réfrigération.....	78
2.3. Caractéristiques des sites contaminés en <i>Listeria</i> .....	79
2.3.1. Accessibilité.....	79
2.3.2. Nature des sites contaminés.....	81
2.4. Evolution dans le temps de la contamination des locaux en <i>Listeria</i> .....	82
2.5. Résultats des boîtes contact pour la Flore Mésophile Totale.....	84
2.6. Résultats en ATP.....	84
2.7. Corrélation entre ATP et boîtes contact.....	85
2.8. Lien entre les résultats <i>Listeria</i> et les résultats de boîtes contact.....	88
2.9. Lien entre les résultats <i>Listeria</i> et les résultats ATP.....	90

<b>3. Discussion conclusion .....</b>	<b>92</b>
<b>CONCLUSION GENERALE .....</b>	<b>95</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>96</b>
<b>Références normatives .....</b>	<b>103</b>

## Table des illustrations

Tableau 1 : Caractères biochimiques communs au genre <i>Listeria</i> .....	20
Tableau 2 : Caractères biochimiques différenciant les espèces de <i>Listeria</i> .....	20
Tableau 3 : Distribution des sérovars dans les espèces de <i>Listeria</i> .....	21
Tableau 4: Temps de génération de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	27
Tableau 5: Méthodes normalisées et méthodes validées de détection et de dénombrement des <i>Listeria</i> et de <i>L. monocytogenes</i> au 18/09/02 .....	31
Tableau 6: Espèces animales concernées par l'infection à <i>L. monocytogenes</i> .....	34
Tableau 7: Taux de portage de <i>Listeria monocytogenes</i> chez le porc.....	36
Tableau 8: Epidémies survenues depuis 1980 en France et dans d'autres pays et aliments incriminés (au 01/07/00).....	42
Tableau 9: Niveau de contamination à la distribution par catégorie d'aliments – Plan de contrôle DGCCRF 1993-96 .....	43
Tableau 10: Différences de contamination dans chaque catégorie d'aliments - Plan de contrôle DGCCRF 1993-96 .....	43
Tableau 11: Niveau de contamination à la distribution par catégories d'aliments Contrôles DGCCRF de 1993 à 2001 .....	44
Tableau 12: Précautions à prendre pour la prévention de la listériose chez les femmes enceintes, les patients immuno-déprimés et les personnes âgées.....	47
Tableau 13 : Pourcentage de carcasses de porc contaminés en <i>L. monocytogenes</i>	53
Tableau 14 : Pourcentages de pièces de découpe de porc contaminées par <i>L. monocytogenes</i> .....	54
Tableau 15 : Pourcentages de sites environnementaux contaminés par <i>L. monocytogenes</i> .....	55
Tableau 16 : Classement des aliments et seuils critiques de l'annexe 4 de la note de service DGAI/SDHA/N98/N°8088 modifiée par la circulaire n°0125 du 19/01/00. ....	57
Tableau 17: Pourcentages de sites contaminés en <i>Listeria monocytogenes</i> et en autres espèces de <i>Listeria</i> en découpe et ressuage .....	70
Tableau 18 : Prélèvements positifs en <i>Listeria monocytogenes</i> dans les salles de découpe après-nettoyage-désinfection .....	71
Tableau 19 : Prélèvements positifs en <i>Listeria monocytogenes</i> , par répétition, dans les salles de découpe après-nettoyage-désinfection, dans les ateliers « faiblement contaminés ».....	72
Tableau 20 : Prélèvements positifs en <i>Listeria monocytogenes</i> , par répétition, dans les salles de découpe après-nettoyage-désinfection, dans les ateliers « fortement contaminés » .....	73

Tableau 21 : Prélèvements positifs en <i>Listeria monocytogenes</i> dans les frigos de ressuage.....	76
Tableau 22 : Prélèvements positifs en <i>Listeria monocytogenes</i> , par répétition, dans les frigos de ressuage après-nettoyage-désinfection *, dans les ateliers « faiblement » contaminés.....	77
Tableau 23 : Prélèvements positifs en <i>Listeria monocytogenes</i> , par répétition, dans les frigos de ressuage après-nettoyage-désinfection *, dans les ateliers « fortement contaminés » .....	77
Tableau 24 : Prélèvements positifs en <i>Listeria monocytogenes</i> selon les types de ressuage.....	79
Tableau 25 : Contamination en <i>Listeria</i> des sites de découpe et de ressuage selon leur accessibilité .....	79
Tableau 26 : Contamination en <i>Listeria</i> des sites de découpe selon leur accessibilité .....	80
Tableau 27: Contamination en <i>Listeria</i> des sites de ressuage selon leur accessibilité .....	80
Tableau 28 : Répartition des sites positifs en <i>Listeria</i> en découpe .....	81
Tableau 29 : Sites positifs en <i>Listeria</i> en découpe dans l'atelier 1 .....	82
Tableau 30 : Sites positifs en <i>Listeria</i> en découpe dans l'atelier 8 .....	83
Tableau 31 : Sites positifs en <i>Listeria</i> en ressuage dans l'atelier 4 .....	83
Tableau 32 : Résultats de dénombrement de la Flore Mésophile Totale par boîtes contact selon l'accessibilité des sites, découpe et ressuage confondus .....	84
Tableau 33 : Résultats d'ATP-métrie selon l'accessibilité des sites, découpe et ressuage confondus .....	85
Tableau 34 : Corrélacion entre ATP-métrie et boîtes contact.....	86
Tableau 35 : Notes globales de boîtes contact et pourcentages de présence de <i>Listeria monocytogenes</i> par répétition en découpe (exemple de 4 ateliers).....	90
Figure 1: Schéma du mode opératoire de la recherche de <i>Listeria monocytogenes</i> dans les aliments selon la méthode de routine AFNOR NF V08-055.....	30
Figure 2: Principales étapes de l'abattage des porcs .....	49
Figure 3: Diagramme des analyses <i>Listeria</i> réalisées sur les chiffonnettes .....	61
Figure 4 : Molécule d'ATP .....	63
Figure 5 : Principe de l'ATP-métrie .....	64
Figure 6 : L'ATP-métrie pour valider le nettoyage .....	65
Figure 7 : Mode opératoire de l'ATP-mètre Hy-Lite. ....	66
Figure 8: Plan d'échantillonnage des prélèvements en chiffonnettes et des analyses, à chaque répétition, et chronologie des répétitions .....	69

Graphique 1 : Répartition des notes de boîtes contact en fonction des classes d'ATP .....	86
Graphique 2: Répartition des classes d'ATP en fonction des notes de boîtes contact .....	87
Graphique 3 : Répartition des classes de boîtes contact en fonction des résultats <i>Listeria monocytogenes</i> et autres <i>Listeria</i> spp. ....	88
Graphique 4 : Répartition des classes de boîtes contact en fonction des résultats <i>Listeria</i> .....	89
Graphique 5 : Répartition des classes d'ATP en fonction des résultats <i>Listeria</i> .....	91

## Lexique

Nb : Les termes définis dans ce lexique sont repérés dans le texte par une étoile

- **Bactériophage** : virus des bactéries ayant un génome à ADN ou ARN. Les phages à ADN sont capables de faire pénétrer dans la bactérie leur acide nucléique entraînant soit la lyse de la bactérie soit son infection chronique puis sa lyse. En raison de leur très grande spécificité d'hôte, les phages peuvent être utilisés comme marqueur des souches bactériennes.
- **Camp (Epreuve de)** : Epreuve fondée sur la mise en évidence d'une activité hémolytique sur des hématies de mouton en présence de toxine staphylococcique réalisée notamment lors de la recherche de *Listeria monocytogenes* pour la confirmation de l'espèce. En pratique, une gélose au sang de mouton est ensemencée en stries parallèles avec les souches à identifier et perpendiculairement avec une souche de *Staphylococcus aureus* et une souche de *Rhodococcus equi*. *Listeria monocytogenes* et *Listeria seeligeri* développent une hémolyse  $\beta$  avec *Staphylococcus aureus* alors que *Listeria ivanovii* la développe avec *Rhodococcus equi*.
- **Clone** : en épidémiologie bactérienne correspond à un génotype donné ou plus généralement à un ensemble de génotypes très proches les uns des autres.
- **$D_{T^{\circ}C}$  : Temps de réduction décimale à la température  $T^{\circ}C$**  = Temps nécessaire à la température  $T^{\circ}C$  pour réduire de 90% la population bactérienne initiale.
- **$D_{10}$  : Dose de réduction décimale**= Dose nécessaire pour réduire de 90% la population bactérienne initiale.
- **G+C mol p.100** ou GC% ou G+C% : pourcentage molaire des bases guanine (G) + cytosine (C) par rapport à l'ensemble des bases de l'ADN (Guanine+Cytosine+Adénine+Thymine).
- **Isolat** : population de cellules bactériennes en culture pure, dérivée d'une colonie unique recueillie sur une gélose d'isolement et caractérisée jusqu'au niveau de l'espèce bactérienne.
- **Rouge de méthyle (Réaction au)** : réaction permettant notamment de différencier la fermentation acide mixte de la fermentation butylène-glycolique chez les entérobactéries.
- **Voges-Proskauer (Réaction de)** : Réaction de mise en évidence de l'acétylméthylcarbinol (AMC) ou de l'acétoïne.

## INTRODUCTION GENERALE

« *Listeria* et l'Hystérie » ainsi le journal Le Monde titrait-il un de ses articles consacré à la « bactérie tueuse » (Le Monde, 20/01/2000).

C'est régulièrement, depuis les années quatre-vingt, que *Listeria monocytogenes* est mise de la sorte sur le devant de la scène médiatique. La raison en est que cette bactérie, largement répandue dans l'environnement, peut provoquer chez l'homme une maladie rare mais mortelle, la listériose.

La listériose est une maladie d'origine alimentaire. Elle était communément associée aux produits laitiers jusqu'à ce que les épidémies de 1992 et 1993 révèlent l'implication de produits de charcuterie : langue de porc en gelée et rillettes. Depuis, la filière porcine a été, à plusieurs reprises, mise en cause lors d'épidémies de listériose humaine.

Afin de garantir la sécurité du consommateur mais aussi pour faire face à tout épisode médiatique aux conséquences ravageuses sur la consommation, la maîtrise de la contamination des produits par *Listeria monocytogenes* s'intègre aujourd'hui pleinement dans la politique qualité des industriels de la filière porcine. Cette maîtrise passe inévitablement par la détermination, aux différentes étapes de production, des points à risque majeur d'introduction et d'amplification du danger *Listeria monocytogenes*.

A ce titre, plusieurs études (Giovannacci, 1999 ; Corrége, 1997) s'accordent à montrer que la contamination par *Listeria monocytogenes* des locaux de production et, plus précisément, la persistance dans le temps de « niches de contamination », constituent un risque majeur de contamination des produits par ce germe. Pour les carcasses et les pièces de découpe de porc les locaux de ressuage et de découpe ont été identifiés comme particulièrement à risque.

Contrôler régulièrement la contamination de ces locaux par *Listeria monocytogenes* permettrait donc de détecter toute présence excessive ou endémique de ce germe dans l'environnement et ainsi de mettre en place les mesures correctives et préventives adéquates pour éliminer les niches de contamination et ainsi éviter les répercussions sur la contamination des produits.

L'Institut Technique du Porc (ITP) a initié une étude, qui a fait l'objet de mon travail de thèse, afin de contrôler la contamination environnementale par *Listeria monocytogenes* de certains locaux en industrie d'abattage et de découpe de porc.

Les objectifs de cette étude sont donc :

- de faire un état des lieux de la contamination par *Listeria monocytogenes* des frigos de ressuage et salles de découpe.
- de définir un plan de contrôle de la contamination par *Listeria monocytogenes* de ces locaux :
  - méthodes de contrôle
  - nombre et nature des sites à contrôler
  - analyses à effectuer
  - fréquence de contrôle

- d'établir certaines préconisations en matière de nettoyage-désinfection afin d'éliminer dans l'environnement ces niches de contamination par *Listeria monocytogenes* ou mieux d'en éviter l'installation.

Ce plan de contrôle constituera, pour les industriels de l'abattage-découpe de porc, un outil supplémentaire pour la maîtrise de la contamination des produits carnés d'origine porcine par *Listeria monocytogenes*.

Préalablement à la présentation des travaux expérimentaux, une synthèse bibliographique est exposée en première partie de ce mémoire. Cette synthèse est consacrée aux caractéristiques de la bactérie et à sa détection, à la maladie qu'elle peut engendrer, la listériose, ainsi qu'à l'importance de ce germe dans la filière porcine.

## **PARTIE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE**

# Chapitre I : Caractéristiques générales des *Listeria*

## 1. Taxonomie

*Listeria monocytogenes*, espèce type du genre *Listeria*, a été décrite pour la première fois en 1926 par Murray et *al.* sous le nom de « *Bacterium monocytogenes* ». La bactérie avait alors été isolée à partir de lapins et de cobayes malades. En 1927, Pirie a isolé du foie de gerbilles une bactérie qu'il nomme « *Listerella hepatolytica* » (Pirie, 1927). Finalement, c'est en 1940 que Pirie a proposé la nomenclature de *Listeria monocytogenes* qui sera retenue par les Approved Lists of Bacterial Names.

Depuis, d'autres espèces de *Listeria* ont été décrites et, grâce notamment aux méthodes d'analyses génétiques, la systématique du genre *Listeria* a été affinée.

Il est désormais admis que le genre *Listeria* appartient à la branche phylogénétique des *Clostridium* tout comme *Staphylococcus*, *Lactobacillus*, *Bacillus* et *Brochothrix*. Ces genres bactériens sont caractérisés par un faible G+C% \* (compris entre 36 et 42), la présence d'acides lipotéichoïques et l'absence d'acides mycoliques. A ce jour, le genre *Listeria* (*L.*) comprend six espèces : *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii* dont *L. ivanovii* subspecies *ivanovii* et *L. ivanovii* subspecies *londoniensis*, *L. welshimeri* et *L. grayi* (Larpent, 2000).

## 2. Caractéristiques phénotypiques

(Seeliger, H. P. R. et Jones, D., 1986 ; Larpent J. P., 2000 ; Euzéby, J. P., 2000 ; Rapport AFFSA, 2000)

### 2.1. Caractéristiques morphologiques et structurales

Les cellules de *Listeria* sont des bacilles à coloration de Gram positif se présentant sous forme de bâtonnets courts et réguliers de 0,4 à 0,5 µm de diamètre sur 0,5 à 2 µm de long, aux extrémités arrondies, certaines cellules pouvant toutefois être incurvées. Elles se présentent de manière isolée ou groupées en V ou en L, en palissade ou en courte chaînette.

Les *Listeria* sont des bactéries non acido-alcool-résistantes, non capsulées, non sporulées et sans structure extra-cellulaire telle que les fimbriae.

Lorsque la culture est réalisée à 20-25°C elles sont mobiles grâce à quelques flagelles de type péritriches.

### 2.2. Caractéristiques biochimiques et métaboliques

*Listeria* est une bactérie aérobie micro-aérophile et anaérobie facultative.

Les caractères biochimiques communs au genre *Listeria* sont présentés dans le tableau 1.

Tableau 1 : Caractères biochimiques communs au genre *Listeria*  
(d'après Larpent, 2000).

Réactions positives	Réactions négatives
Mobilité à 22°C	
Catalase	Oxydase
Acidification du glucose, fructose, mannose, amygdaline, salicine, cellobiose, maltose, tréhalose, arabitol	Production de gaz lors de la fermentation du glucose
Rouge de Méthyle */Voges-Proskauer *	Uréase (Hydrolyse de l'urée)
Hydrolyse de l'esculine	Production d' Indole
Type respiratoire : aéro-anaérobie	Gélatinase (Hydrolyse de la gélatine )
Réduction du lait tournesolé	Production d'H <sub>2</sub> S

La différenciation des espèces du genre *Listeria* est principalement fondée sur les caractères mentionnés dans le tableau 2.

Tableau 2 : Caractères biochimiques différenciant les espèces de *Listeria*  
(d'après Rocourt et Jacquet, 2000).

	Hémolyse	CAMP test <i>S. aureus</i> *	CAMP test <i>R. equi</i> **	D-xylose ***	L-rhamnose ***	α méthyl-D- mannoside ***	Ribose ***	Mannitol ***
<i>L. monocytogenes</i>	+	+	-	-	+	+	-	-
<i>L. ivanovii</i> ( <i>subsp. ivanovii</i> )	+	-	-	+	-	-	+	-
<i>L. ivanovii</i> ( <i>subsp. londoniensis</i> )	+	-	+	+	-	Variable	-	-
<i>L. innocua</i>	-	-	-	-	Variable	+	-	-
<i>L. welshimeri</i>	-	-	-	+	Variable	+	-	-
<i>L. seeligeri</i>	+	+	-	+	-	-	-	-
<i>L. grayi</i>	-	-	-	-	-	Non défini	-	+

\* *Staphylococcus aureus* ; \*\* *Rhodococcus equi* ; \*\*\* production d'acide à partir de  
(+ : positif, - : négatif)

### 3. Caractérisation infra-spécifique

Le typage des souches permet de subdiviser les groupes bactériens à un degré inférieur à celui de l'espèce et ainsi de comparer finement les isolats \*. Il est alors possible de suivre la dissémination des bactéries dans l'environnement et d'identifier l'origine des contaminations. C'est un outil indispensable d'une part pour une meilleure connaissance de l'écologie de la bactérie, d'autre part dans le cadre d'enquêtes épidémiologiques.

Les méthodes de typage phénotypiques, très anciennes, sont complétées, depuis environ 10 ans, par des méthodes génotypiques visant à étudier le polymorphisme de séquences d'ADN. Ces méthodes génétiques ont été rapidement appliquées à *L. monocytogenes* en raison de l'importance du problème épidémiologique posé par la listériose humaine dont elle est à l'origine.

#### 3.1. Typage phénotypique

##### 3.1.1. Sérotypie

Elle est fondée sur la mise en évidence d'antigènes somatiques (antigènes O) et d'antigènes flagellaires (antigène H). On distingue au sein du genre *Listeria* 15 antigènes somatiques (I à XV) et 5 antigènes flagellaires (A à E). La combinaison de ces différents facteurs dans une même bactérie permet de reconnaître actuellement 17 sérovars de *Listeria* (Donker-Voet, 1972 ; Garcia et al, 1990; Larpent, 2000; Paterson, 1940 ; Seeliger et Höhne, 1979) (tableau 3).

Tableau 3 : Distribution des sérovars dans les espèces de *Listeria*  
(Larpent, 2000)

Espèces	Sérovars
<i>L. monocytogenes</i>	1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, 7
<i>L. innocua</i>	3, 6a, 6b, 4ab
<i>L. ivanovii</i>	5
<i>L. seeligeri</i>	1/2a, 1/2b, 1/2c, 4b, 4c, 4d, 6b
<i>L. welshimeri</i>	1/2a, 4c, 6a, 6b

En France actuellement la sérotypie est d'intérêt limité car elle est peu discriminante. En effet environ 95% des souches de *Listeria monocytogenes* isolées en pathologie humaine sont du sérovar 4b, 1/2a ou 1/2b (Farber et Peterkin, 1991 ; Rocourt et Bille, 1997 ; Goulet et al., 2001). Par ailleurs il a été démontré que les sérotypes 1/2a, 1/2b et 1/2c étaient largement prédominants dans le milieu de la viande (Jay, 1996 ; Giovannacci, 1999).

Toutefois cette technique est toujours utilisée en première approche en épidémiologie descriptive.

### 3.1.2. Lysotypie

La lysotypie est fondée sur la sensibilité de la bactérie aux bactériophages \* (Audurier et *al.*, 1977 ; Rocourt et *al.*, 1985). Elle consiste à déterminer le lysotype, c'est à dire l'ensemble des phages qui manifestent une activité lytique détectable contre la souche étudiée.

Cette technique est plus discriminante que la sérotypie en permettant de subdiviser les souches d'un même sérovar. Elle reste toujours employée dans le cadre de la surveillance épidémiologique des listérioses. Cependant elle présente parfois une capacité de typage limitée toutes les souches n'étant pas lysotypables.

L'utilisation de cette technique reste limitée aux Centres Nationaux de Référence compte-tenu du savoir faire exigé et de la non-disponibilité des phages.

### 3.1.3. Electrophorèse d'isoenzymes

L'électrophorèse d'isoenzymes (MultiLocus Enzyme Electrophoresis=MLEE) est une méthode génétique indirecte. Elle consiste en l'analyse de la mobilité électrophorétique de plusieurs enzymes métaboliques. Les différents profils électrophorétiques obtenus pour chaque enzyme sont mis en relation avec les allèles situés sur les loci de gènes de structure et ce qui permet donc d'analyser les variations génétiques au sein d'une population bactérienne.

Pour *Listeria monocytogenes* l'analyse des électrotypes permet d'individualiser deux grandes subdivisions. L'une constituée par les sérovars 1/2b, 3b, et 4b, comporte au moins 22 électrotypes différents et l'autre, constituée par les serovars 1/2a, 1/2c et 3a, comporte au moins 45 électrotypes différents (Euzéby, 2000).

Cette technique de typage a été appliquée dès 1989 à *L. monocytogenes* (Piffaretti et *al.*, 1989 ; Bibb et *al.*, 1990). Son utilisation reste cependant limitée car elle est peu discriminante pour *L. monocytogenes* par rapport à d'autres techniques génétiques (Kerouanton et *al.*, 1998), son délai de réponse est long et sa mise en oeuvre lourde.

## **3.2. *Typages génotypiques de Listeria monocytogenes***

### 3.2.1. Marqueurs liés à l'ADN plasmidique

La caractérisation de profils plasmidiques de souches bactériennes consiste en l'analyse par électrophorèse du nombre et de la taille des plasmides. La comparaison de profils de restriction de plasmides accroît le pouvoir discriminant de la technique et permet d'évaluer le degré de parenté entre des plasmides de tailles similaires. En effet des plasmides de taille identique peuvent générer des profils de restriction différents (Giovannacci, 1999).

Pour les *Listeria*, l'analyse des plasmides a peu d'intérêt car de nombreuses souches en sont dépourvues. Par ailleurs, lorsqu'ils sont présents, leur diversité est faible (Perez-Diaz et *al.*, 1982 ; Fistrovici et Collins-Thompson, 1990).

### 3.2.2. Marqueurs liés à l'ADN chromosomique

Les techniques permettant d'étudier le polymorphisme de l'ADN chromosomique sont aujourd'hui nombreuses. Elles font appel à des processus variés dont la restriction et l'amplification de l'ADN.

### 3.2.2.1. Polymorphisme de l'ADN chromosomique révélé par restriction - Analyse RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) du chromosome

#### 3.2.2.1.1. Microrestriction et Electrophorèse classique

Le principe de cette méthode de typage consiste à séparer, par électrophorèse conventionnelle (séparation par effet tamisant), les fragments d'ADN du chromosome bactérien obtenus après digestion par une enzyme de restriction puis à comparer les profils ainsi obtenus (Rocourt, 1991).

Cette technique fait appel à des enzymes de restriction (comme *EcoRI*) engendrant de nombreux fragments d'ADN (microrestriction). De ce fait, les profils électrophorétiques obtenus comprennent de nombreuses bandes de migration et sont donc difficiles à interpréter.

Cette technique, très discriminante, s'est avérée utile dans certaines enquêtes épidémiologiques mais compte tenu de sa complexité d'interprétation d'autres techniques de RFLP ont été développées.

#### 3.2.2.1.2. Macrorestriction et Electrophorèse en champ pulsé (=pulsotypage)

Cette technique, à la différence de la microrestriction, fait appel à des enzymes (*Apal*, *SmaI*, *NotI*) reconnaissant des sites de coupure rarement distribués sur le chromosome. Le nombre de fragments d'ADN bactérien à analyser est donc faible mais ces fragments sont de grande taille. Le recours à des techniques d'électrophorèses particulières telles que le champ pulsé est alors nécessaire pour séparer ces gros fragments d'ADN (supérieur à 100 kd).

L'électrophorèse sur gel en champ pulsé ou PFGE (=Pulsed-Field Gel Electrophoresis) est basée sur l'utilisation de deux champs électriques, d'orientations différentes, appliqués de manière alternative. La différence de direction des champs permet aux molécules de se réorienter, la vitesse et la direction de cette réorientation étant liée à leur taille (Rocourt, 1991).

Cette technique de typage, macrorestriction de l'ADN et pulsotypage, donne des profils génomiques aisément interprétables. C'est une technique reproductible et parmi les plus discriminantes pour *L. monocytogenes* (Brosch et al., 1994). Elle est à l'heure actuelle très largement employée dans un but épidémiologique notamment pour comparer des souches isolées d'aliments à celles isolées de patients (Boerlin et al., 1997 ; Franciosa et al., 1998) mais aussi pour analyser la traçabilité des souches au sein de sites de production industriels (Giovannacci, 1999).

#### 3.2.2.1.3. Hybridation sélective des fragments de restriction de l'ADN chromosomique

(Giovannacci, 1999 ; Rocourt, 1991 ; AFSSA, 2000)

##### 3.2.2.1.3.1. Principe de la technique

Il est également possible d'obtenir des profils d'ADN avec peu de fragments de restriction observables, et donc faciles à lire, en couplant une électrophorèse d'ADN total à une hybridation sélective. Pour cela, des sondes d'ADN, complémentaires d'un élément répété dans le génome présent sur seulement quelques fragments de

restriction, sont utilisées. La visualisation des sondes ne met alors en valeur que les fragments de restriction hybridés c'est à dire qui comportent cet élément répété.

Les sondes sont marquées par des systèmes « froids » (= non radioactifs) et révélées par réaction colorimétrique ou de fluorescence par ajout d'un conjugué anti-corps-enzyme et d'un substrat.

Les sondes utilisées sont variées, certaines universelles d'autres plus spécifiques d'espèce voire de sérotype.

#### 3.2.2.1.3.2. Exemple : le ribotypage

Cette méthode consiste à comparer les profils de restriction des gènes codant pour l'ARN ribosomique. Ces profils sont obtenus après hybridation de l'ADN chromosomique restreint avec un ARN ribosomique ou son équivalent en ADN.

L'intérêt de cette méthode est qu'elle porte sur l'ARN qui est un matériel génétique particulièrement bien adapté à l'analyse comparative des bactéries : il est universellement distribué, relativement stable et présent en de multiples copies dans le génome bactérien.

En ce qui concerne *L. monocytogenes* deux sondes ont été utilisées, l'une constituée par les ARN ribosomique 16S et 23S de *E. coli* et l'autre par les gènes codant pour l'ARN ribosomique 16S de *Bacillus subtilis*. *EcoRI* est apparue comme l'enzyme de restriction le plus approprié pour une discrimination optimale des souches.

Le pouvoir discriminant de cette technique vis-à-vis de *L. monocytogenes* est faible, notamment pour les souches de sérotypes 4b et 1/2b (Graves et al., 1994) et toujours inférieur à celui de la macrorestriction.

Une automatisation de la technique a été récemment développée palliant ainsi son inconvénient majeur, la lourdeur et la longueur de réalisation. Ce système, le RiboPrinter™ permet une bonne standardisation de la méthode accompagnée d'une base de données de profils numérisés. Elle devient ainsi accessible à un plus grand nombre de laboratoires. Cependant le coût total de la technique reste élevé et limite son utilisation aux laboratoires de grande capacité.

#### 3.2.2.2. Polymorphisme de l'ADN révélé par amplification

Différentes méthodes de typage bactérien utilisent la réaction de polymérisation en chaîne ou PCR (Polymerase Chain Reaction). Cette technique PCR permet de produire, in vitro, par synthèse enzymatique, une grande quantité de séquences d'ADN (Saiki et al., 1988). L'analyse des profils obtenus après électrophorèse du produit de l'amplification permet de différencier les souches bactériennes.

Ces techniques de typages fondée sur la PCR sont la RAPD, la REP-PCR ou encore la ERIC-PCR.

La RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) utilise une seule amorce oligonucléotidique courte dont la séquence est choisie aléatoirement. Une telle amorce peut s'hybrider en des sites multiples sur les deux brins d'ADN du chromosome et peut ainsi permettre l'amplification de multiples fragments de différentes tailles. Cette technique est rapide, simple et discriminante. L'emploi de plusieurs amorces bien choisies permet d'obtenir un niveau de discrimination équivalent à celui de la macrorestriction. Toutefois son inconvénient est son manque de reproductibilité. En effet de nombreux facteurs tels que la concentration en

amorces, les conditions d'amplification, la concentration et la qualité de l'ADN de l'échantillon interviennent dans la reproductibilité du résultat (Giovannacci, 1999).

La REP-PCR ou la ERIC-PCR utilisent des amorces permettant d'amplifier spécifiquement certaines régions d'ADN.

### 3.2.3. Marqueurs liés aux gènes

(Giovannacci, 1999).

Grâce à l'amplification spécifique obtenue par la PCR il est alors possible d'étudier le polymorphisme d'un gène ou d'une portion de gène.

#### 3.2.3.1. Polymorphisme révélé par restriction

L'amplification par PCR à l'aide d'amorces spécifiques est l'étape préalable qui permet, à partir du chromosome ou du plasmide, d'isoler le gène ou la région génomique d'intérêt. Les étapes de restriction puis d'électrophorèse sur gel sont ensuite réalisées.

Cette technique a permis notamment d'explorer le polymorphisme de plusieurs gènes de virulence de *Listeria monocytogenes* (Vines et al., 1992 ; Ericsson et al., 1995).

#### 3.2.3.2. Polymorphisme révélé par amplification

Cette technique associe l'amplification par PCR de certaines zones du chromosome puis l'électrophorèse du produit de l'amplification sur gel d'agarose.

Un exemple de cette technique est la ribotypie par PCR. L'espace compris entre les gènes codant pour les ARN ribosomiques varie en longueur selon les espèces. Pour *Listeria* le polymorphisme de l'espace compris entre les gènes codant pour l'ARNr 5S et 16S permet de distinguer les espèces du genre *Listeria* mais aussi de distinguer des types à l'intérieur des sérotypes 4b, 1/2a et 1/2b de *Listeria monocytogenes*.

### 3.2.4. Critères d'évaluation des différentes méthodes de typage bactérien

De nombreuses méthodes de typage bactérien fondées sur des marqueurs phénotypiques ou génotypiques sont aujourd'hui disponibles. Se pose donc la question du choix selon les objectifs recherchés.

Pour qualifier une méthode de typage quatre critères sont importants à considérer (Struelens et al., 1996) :

1. La facilité de mise en oeuvre et la rapidité d'obtention des résultats,
2. La reproductibilité : aptitude à classer un isolat dans un même type lors d'essais indépendants et séparés,
3. La stabilité: la stabilité d'un marqueur épidémiologique conditionne la capacité d'un système de typage à reconnaître la parenté de souches dérivées d'un ancêtre commun en dépit des variations phénotypiques ou génotypiques susceptibles de survenir lors du stockage, des manipulations de laboratoire, ou naturellement sur de longues périodes,
4. Le pouvoir discriminant : probabilité à classer deux souches non reliées dans des types différents.

Le sérotypage est de loin la méthode la moins discriminante. La lysotypie quant à elle possède un pouvoir discriminant proche des techniques moléculaires mais malheureusement toutes les souches ne sont pas lysotypables.

Les nouvelles méthodes de typage moléculaires ont certes un pouvoir discriminant élevé mais pour la plupart elles sont longues et coûteuses et certaines sont peu reproductibles.

Ainsi les méthodes de typage traditionnelles, sérotypage et lysotypage, conservent-elles toute leur valeur dans les analyses de routine, les « screening ». Elles permettent une traçabilité suffisante des souches tant au niveau des cas de listériose humaine que pour les études portant sur la présence de *L. monocytogenes* au niveau des denrées alimentaires. Par contre lors d'investigation épidémiologique poussée, lors d'épidémie par exemple pour identifier un lien entre souche alimentaire et souche clinique, ou encore pour étudier la dissémination de souches dans l'environnement, des méthodes très discriminantes sont nécessaires. Il est alors indispensable de faire appel aux méthodes de typage moléculaire.

## 4. Physiologie

Les *Listeria* sont des bactéries largement répandues dans l'environnement. Elles peuvent être présentes dans le sol, dans des végétaux. Elles sont également isolées des égouts et effluents des industries agro-alimentaires. Ce caractère ubiquitaire s'explique par leur résistance importante à certaines conditions environnementales hostiles.

### 4.1. Température

Les *Listeria* sont des bactéries psychrotrophes pouvant se développer à des températures allant de 1°C à 45°C avec un optimum de croissance entre 30 et 37°C (Seeliger et Jones, 1986 ; Junttila *et al.*, 1988). Walker *et al.* (1990) ont montré que certaines souches de *L. monocytogenes* étaient capables de croître jusqu'à -0,4°C si le temps d'incubation est supérieur à 50 jours. Au contraire *L. innocua*, *L. murrayi* et *L. grayi* ne se développent pas respectivement au dessous de 1,7°C, 2,8°C et 3°C (Larpen, 2000).

Toutefois, même si, pour *L. monocytogenes*, un taux de croissance positif est détecté à des températures inférieures à 0°C, celui-ci est extrêmement faible avec des temps de génération allant de 62 à 131 heures, et la croissance n'est observable que pour de longues périodes d'incubation (Walker *et al.*, 1990).

Le temps de latence et le temps de génération sont rapidement réduits si la température s'élève (tableau 4). Par exemple pour *Listeria monocytogenes* sur du bouillon de poulet ils diminuent respectivement de 19 heures et 1-2 jours à 9 heures et 1 jour lorsque la température passe de 5 à 7,5°C (Larpen, 2000).

En pratique ces résultats soulignent la nécessité d'appliquer une réfrigération précoce, intense et continue aux produits alimentaires pour limiter la croissance des *Listeria*.

Tableau 4: Temps de génération de *Listeria monocytogenes* (d'après Ryser et Marth, 1999).

	Temps de génération en heures				
	4°C	8°C	13°C	21°C	35°C
Lait entier	33,27	13,06	5,82	1,86	0,692

#### 4.2. Acidité, pH

*L. monocytogenes* peut se développer dans une large gamme de pH allant de 4,3 à 9,6 avec un optimum à pH neutre ou légèrement alcalin (Seeliger et Jones, 1986 ; George et al., 1988 ; Farber et al., 1989). Ces valeurs de pH dépendent toutefois de la température, de la nature de l'acide et de la nature du milieu (Sorells et al., 1989 ; Corner et al., 1990).

*L. monocytogenes* est rapidement détruite au-dessus de pH 10 ou aux pH inférieurs au  $pH_{min}$  (pH dépendant de l'acide utilisé, notamment de son pKa, de la température du milieu, et au dessous duquel la mort cellulaire survient après une phase de latence plus ou moins longue). Elle peut par exemple survivre pendant de très longues périodes à des pH proches de pH 4 comme c'est le cas dans les ensilages de maïs (AFSSA, 2000).

Cheroutre-Vialette et al. (1998) ont montré que *L. monocytogenes* surmonte mieux un stress alcalin qu'un stress acide.

#### 4.3. Taux de sel

*L. monocytogenes* ne se développe en général pas dans les solutions contenant plus de 10 % à 11 % de NaCl (Nolan et al., 1992 ; Vasseur et al., 1999).

Toutefois, des souches peuvent survivre à des concentrations de sel plus élevées. Par exemple certaines souches survivent dans des saumures de fromagerie contenant de 13 à 14 % de NaCl (Farber et al., 1992). Kukharkova et al. (1960) ont démontré que *L. monocytogenes* survivait plus de 60 jours dans de la viande stockée à 4°C dans une solution de saumure à 30 % de NaCl qui contenait aussi des nitrates. Sielaff (1968) a mis en évidence *L. monocytogenes* dans de la viande de bœuf saumurée dans une solution à 22 % de NaCl, après stockage pendant 100 jours entre 15 et 20°C.

#### 4.4. $A_w$

*Listeria* se développe à un optimum d' $a_w$  de 0,97 mais peut se développer jusqu'à une  $a_w$  de 0,9 (Farber et al., 1992).

Le germe reste viable, sans multiplication, plusieurs jours pour des  $a_w$  plus faibles par exemple 84 jours à +4°C dans un salami dont l'  $a_w$  est de 0,79-0,86 (Jonhson et al., 1988).

## **4.5. Facteurs de destruction des *Listeria***

### **4.5.1. Température**

*L. monocytogenes* n'est pas considérée comme un germe thermorésistant et est rapidement détruite à 60°C (Bréand *et al.* 1998). La pasteurisation traditionnelle (15 secondes à 72°C) est un traitement suffisant pour inactiver les *Listeria* dans les viandes (Larpen, 2000).

Toutefois, l'effet de divers pré-traitements thermiques peut beaucoup influencer sa thermotolérance. Ainsi, un préchauffage à 47,5°C pendant 3 heures (Pagan *et al.*, 1997) est celui qui prolonge le plus la résistance ultérieure à une température de 65°C des bactéries cultivées initialement à 4°C.

Ces résultats montrent que la faculté de préadaptation des *L. monocytogenes* aux traitements thermiques est réelle. Il est possible que cette faculté contribue à la survie de *L. monocytogenes* dans certains aliments subissant, au cours du processus de fabrication, un préchauffage avant pasteurisation.

### **4.5.2. Hautes pressions**

(AFSSA, 2000)

Face à l'effet des hautes pressions, il apparaît que *L. monocytogenes* n'est pas un germe très résistant comparativement à d'autres germes pathogènes tels *Salmonella* Enteritidis, *E. coli* O157:H7 ou *S. aureus*. Il faut néanmoins appliquer 375 MPa pendant 15 minutes (Cheftel et Culioli, 1997) pour réduire la population de 5 unités Log<sub>10</sub> à 20°C. Comme pour beaucoup d'autres paramètres, la résistance varie beaucoup selon les souches et selon le milieu de culture utilisé.

### **4.5.3. Irradiations**

(AFFSA, 2000)

La résistance à l'irradiation par les rayons gamma de *L. monocytogenes* est faible et une dose de 2 kGy est suffisante pour détruire les *L. monocytogenes* aux inoculum habituellement rencontrés dans les aliments (Osterholm et Potter, 1997). La dose de réduction décimale (D<sub>10</sub>\*) se situe, suivant la température et la nature de l'aliment irradié (rayons gamma), entre 0,25 et 0,77 kGy, avec une moyenne aux environs de 0,56 kGy (Huhtanen *et al.*, 1989 ; Monk *et al.*, 1994).

### **4.5.4. Désinfectants**

(AFSSA, 2000 ; Larpen, 2000)

Les *Listeria* ne sont pas particulièrement résistantes aux désinfectants et leur comportement est très proche de celui d'*Enterococcus faecium*, bactérie utilisée dans le cadre des essais d'efficacité des désinfectants. Les essais spécifiques sur *Listeria* ne semblent donc pas indispensables.

Des études ont montré que *L. monocytogenes* est sensible à différents agents couramment utilisés dans l'industrie agro-alimentaire tels que les dérivés chlorés, les dérivés iodés, les acides anioniques ou les ammoniums quaternaires, lorsqu'ils sont utilisés à des concentrations respectives de 100 ppm, 25-45 ppm, 200 ppm et 100-200 ppm (Lopes, 1986 ; Orth et Mrozek, 1989). Cependant beaucoup d'entre eux sont inefficaces en présence de matières organiques (lait, sérum, matières grasses).

Dans les industries agro-alimentaires, afin d'obtenir une efficacité optimale de ces agents désinfectants il est donc nécessaire de respecter un protocole de nettoyage-désinfection dans lequel une étape de détergence, à l'aide notamment d'un alcalin-chloré, précède la désinfection et permet ainsi l'élimination des souillures organiques.

## **5. Méthodes d'analyses**

L'isolement des *Listeria* dans les produits alimentaires est délicat. Les méthodes d'analyse doivent prendre en compte la complexité des matrices alimentaires ainsi que la présence de *Listeria* souvent en très faible nombre accompagnées, en général, d'une flore associée complexe et abondante.

Des milieux et conditions de culture sélectifs des *Listeria* sont donc nécessaires.

A côté des méthodes basées sur la microbiologie conventionnelle, se sont développées des méthodes dites « rapides ». Elles utilisent l'immunologie ou encore la biologie moléculaire et permettent de raccourcir considérablement les délais de réponse, facteur essentiel lors de la recherche de *L. monocytogenes* dans des aliments incriminés lors d'épidémie ou plus fréquemment lors des autocontrôles en production agro-alimentaire.

### **5.1. Méthodes de recherche**

La méthode de recherche normalisée et reconnue Norme Française (NF), Norme Européenne (EN) et Norme Internationale (ISO) est la norme NF EN ISO 11290-1. C'est une méthode lourde, en plusieurs étapes, avec enrichissement primaire et secondaire en bouillon de Fraser et isolements sur milieux sélectifs, PALCAM et Oxford, après chaque étape d'enrichissement. Elle fournit un résultat négatif (absence) en 4 à 5 jours et un résultat positif en 4 à 7 jours.

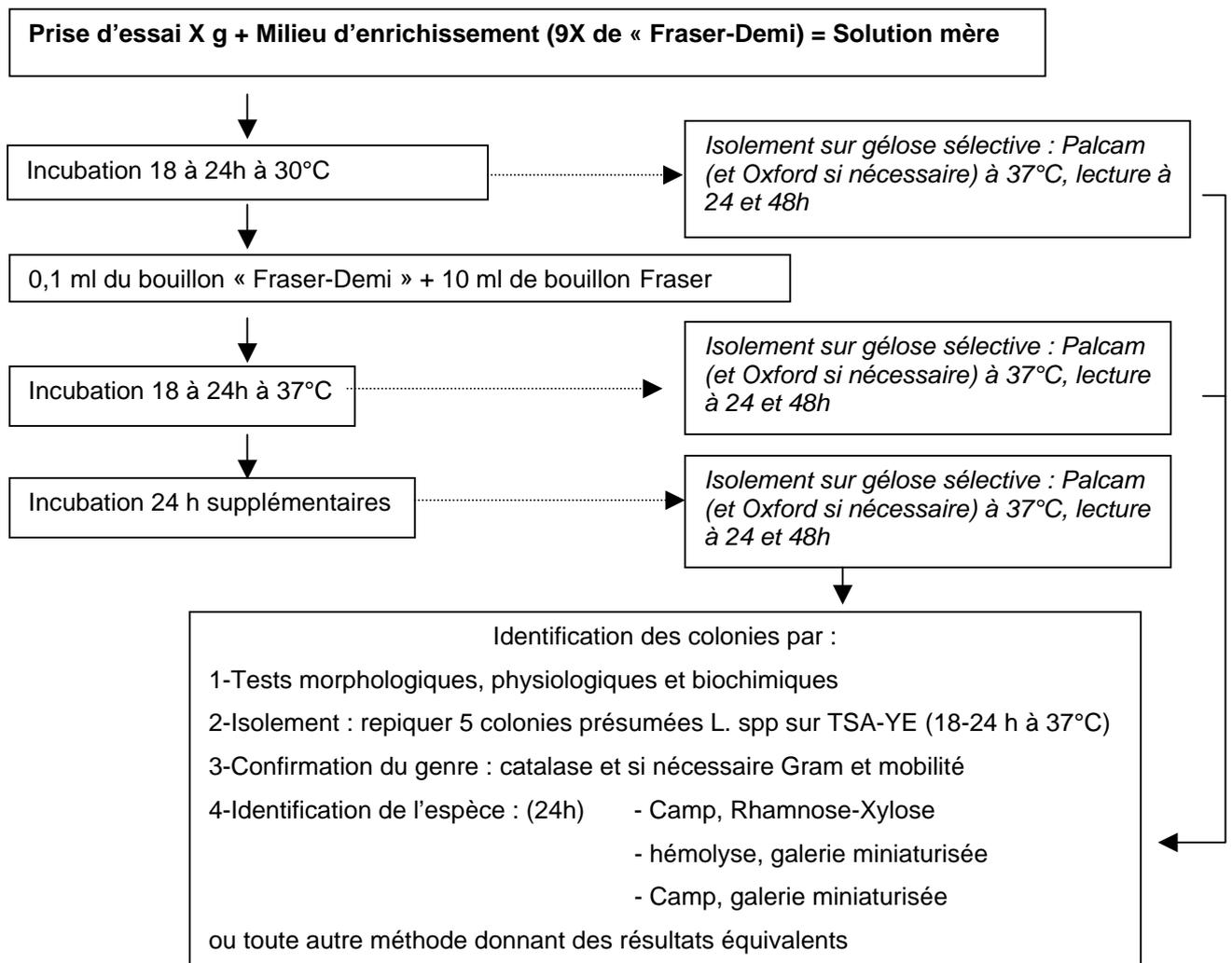
La méthode AFNOR (Association Française de NORmalisation) de routine pour la détection de *L. monocytogenes* correspond à la norme NF V 08-055 (figure 1). Elle nécessite les mêmes délais.

### **5.2. Méthodes de dénombrement**

Le dénombrement des *L. monocytogenes* selon la norme NF EN ISO 11290-2 consiste à ensemencer en surface 0,1ml de la solution mère et ses dilutions successives, sans enrichissement, sur milieu sélectif Palcam.

Cette technique, comme tous les dénombrements, est soumise aux classiques fluctuations d'échantillonnage, dont l'importance relative est très sensible pour les faibles nombres. Un même prélèvement pourra donc être supérieur ou inférieur au seuil choisi, lors de prélèvements itératifs, du fait de problèmes statistiques.

Figure 1: Schéma du mode opératoire de la recherche de *Listeria monocytogenes* dans les aliments selon la méthode de routine AFNOR NF V08-055



### 5.3. Méthodes alternatives

La nécessité d'une réponse rapide a entraîné le développement d'un grand nombre de méthodes commerciales (tableau 5). Elles nécessitent toutes au minimum une phase d'enrichissement sélectif avant l'application d'un test de type immunoenzymatique, d'un test d'hybridation des acides nucléiques ou d'une d'amplification génique. Ces méthodes permettent de faire un tri rapide dans un délai de 2 à 3 jours entre les échantillons mesurés positifs et les négatifs. Cependant, tout résultat positif doit être confirmé par des méthodes classiques : isolement sur milieu sélectif et identification des colonies présentes.

L'étape d'enrichissement peut être améliorée par l'utilisation de billes immuno-magnétiques.

Tableau 5: Méthodes normalisées et méthodes validées de détection et de dénombrement des *Listeria* et de *L. monocytogenes* au 18/09/02

(Verhoye, 2002)

Méthodes normalisées		
De référence	NF/EN ISO 11290-1 NF/EN ISO 11290-2	Détection Dénombrement
De routine	NF V08- 055	Détection
Méthodes validées AFNOR (producteur)		
Culture (milieu chromogènes)	Rapid'L. mono (aliments) (Bio-Rad)	Détection
	Rapid'L. mono (laitiers, carnés, pêche) (Bio-Rad)	Dénombrement
	ALOA ONE DAY (aliments) (AES)	Détection
	Chromagar <i>Listeria</i> (aliments, environnement) (CHROMagar)	Détection
	Compass L. mono (aliments environnement) (Biokar)	Détection
Test immunoenzymatique	Vidas <i>Listeria</i> (aliments, environnement) (bioMérieux) *	Détection
	Transia Plate <i>Listeria</i> (aliments) (Diffchamb) *	Détection
	Vidas <i>L. monocytogenes</i> (aliments) (bioMérieux)	Détection
	Vidas <i>L. monocytogenes</i> 2 (aliments, environnement) (bioMérieux)	Détection
Test immunologique	<i>Listeria</i> Rapid-Test (aliments) (Oxoid) *	Détection
Hybridation des acides nucléiques	Accuprobe <i>L. monocytogenes</i> (aliments)	Détection (Confirmation sur étalement sans subculture)
Amplification génique (PCR)	Probelia <i>L. monocytogenes</i> (aliments) (Biorad)	Détection
Séparation Immuno-magnétique (IMS)	Dynabeads anti- <i>Listeria</i> (Dynal) *	Détection (enrichissement sélectif)

\* Méthode pour le genre *Listeria*

#### 5.4. Isolement et Identification

Quelle que soit la méthode normalisée, l'isolement des colonies se fait sur des milieux sélectifs: gélose Oxford et/ou PALCAM. Ces géloses ne permettent pas de différencier les espèces de *Listeria*, or la méthode normalisée demande le repiquage sur gélose trypticase soja (TSYE) de cinq colonies par boîte d'isolement pour procéder à l'identification de l'espèce.

La confirmation de l'appartenance au genre *Listeria* se fait à partir des colonies ayant un aspect caractéristique sur les milieux d'isolement sélectif par la mise en évidence

de la catalase, la vérification de la mobilité au microscope à partir d'un bouillon incubé à 25°C ou en gélose de mobilité.

L'espèce *monocytogenes* est identifiée par les caractères suivants : par Camp test + sur *Staphylococcus aureus* et – sur *Rhodococcus equi*, hémolyse +, xylose – et rhamose +. Des galeries miniaturisées facilitent le diagnostic.

Des nouveaux milieux de culture différentiels permettent aujourd'hui la distinction spécifique de *L. monocytogenes*. Quatre milieux de culture chromogènes ont été validés par la commission AFNOR (tableau 5). Ils sont fondés sur la présence de l'activité Phosphatidyl Inositol Phospholipase C obtenue avec *L. monocytogenes* mais aussi avec *L. ivanovii* qui forment des colonies bleues. La différenciation se fait ensuite à l'aide d'un caractère biochimique négatif pour *L. monocytogenes* (ex : xylose) ou encore par la présence d'antibiotiques empêchant la croissance des *L. ivanovii*. Les colonies de *Listeria monocytogenes* apparaissent bleues avec ou sans halo selon les milieux.

### **5.5. Problèmes liés à l'échantillon**

Certains paramètres doivent entrer en ligne de compte pour l'interprétation finale d'un résultat de détection ou de dénombrement de *Listeria* dans les denrées alimentaires, notamment des facteurs relatifs au prélèvement (Catteau, 1999).

D'une part la contamination des produits analysés est hétérogène tant au sein d'une unité que d'un lot et ce d'autant plus que le taux de contamination est faible. Pour un même lot de fabrication par exemple, certains produits peuvent être contaminés et d'autres non. De même, dans un échantillon, un prélèvement d'un volume ou d'une surface donnée pourra contenir ou ne pas contenir la bactérie. C'est le phénomène classique des fluctuations d'échantillonnage. Le plan d'échantillonnage (nombre, taille et méthode de prélèvement...) revêt donc une importance considérable dans la pertinence et l'interprétation des résultats. Sa sévérité doit découler de l'homogénéité de la contamination, du nombre d'unités défectueuses que l'on considère comme acceptable dans le lot, en fonction de la signification en terme de santé publique de la présence de *L. monocytogenes* dans l'aliment considéré (AFSSA, 2000).

D'autre part les *Listeria* présentes dans l'échantillon peuvent être stressées du fait des traitements subis au cours du process : chauffage, congélation, salage, etc...ou encore du fait de contact avec des produits désinfectants dans le cadre des prélèvements environnementaux. Les souches stressées ne seront pas toujours détectées lors des analyses utilisant des milieux fortement sélectifs comme la gélose PALCAM. A l'inverse l'utilisation de milieux moins sélectifs, comme le milieu Oxford, permettra la croissance des souches stressées mais également celle de flores associées qui pourront alors masquer les *Listeria*. Ainsi, dans certains cas, une étape de revivification (échantillon placé quelques heures, dans un bouillon non sélectif, à température ambiante) est recommandée. Pour les prélèvements environnementaux réalisés après les étapes de désinfection l'ajout de neutralisant à 10% est recommandé.

## Chapitre II : Les listérioses animales et humaines

L'homme et de nombreuses espèces animales peuvent être atteints de listériose.

Seule *L. monocytogenes* est reconnue comme pathogène pour les animaux et surtout pour l'homme. *L. ivanovii* peut être pathogène pour les petits ruminants, particulièrement chez les ovins (Hof et Hefner, 1988).

La gravité des infections à *L. monocytogenes* est liée au pouvoir invasif de la bactérie capable de traverser le placenta et de pénétrer le système nerveux central (Farber et Peterkin, 1991).

Chez l'homme, la mortalité globale est estimée à 25-30 % et les séquelles neurologiques sont très fréquentes en dépit de l'antibiothérapie.

### 1. Listérioses animales

La listériose est une infection essentiellement animale, accidentellement humaine. Elle sévit de façon sporadique chez les animaux.

La contamination des animaux s'effectue le plus généralement par ingestion de végétaux contaminés (Goret et Joubert, 1976).

#### 1.1. Espèces infectées

Près de soixante espèces animales peuvent être infectées par *L. monocytogenes* (tableau 6) (AFSSA, 2000) mais en réalité la listériose maladie affecte essentiellement les ovins (dans plus de trois cas sur cinq) et plus rarement les bovins et les caprins. Dans l'espèce porcine la listériose maladie est exceptionnelle alors que le portage asymptomatique est fréquent (Carlier, 1992).

#### 1.2. Tableaux cliniques

(Cottureau et Laval, 1972 ; Carlier, 1992)

Les symptômes varient selon les espèces atteintes. Toutefois il est possible de distinguer trois formes majeures :

- Une forme nerveuse ou méningo-encéphalique : c'est la forme la plus fréquente chez les ruminants et notamment le mouton chez qui on l'appelle « circling disease ». Des signes nerveux associés à une hyperthermie apparaissent : mouvements incoordonnés, répétitifs, les animaux « poussent au mur » et tournent en rond (d'où « circling disease »), paralysie, dyspnée. Chez le porc cette forme est constatée essentiellement sur le porcelet à la mamelle. Ce dernier peut guérir spontanément alors que chez les autres espèces l'issue est généralement fatale;
- Une forme septicémique, fréquente chez les jeunes animaux et les rongeurs. Les symptômes sont ceux d'une septicémie banale : fièvre, congestion généralisée, coma. L'évolution est rapidement fatale;
- Une forme génitale qui entraîne des avortements chez les ruminants et les rongeurs.

Des formes localisées sont également décrites : cutanées, mammaires (mammites), oculaires.

Tableau 6: Espèces animales concernées par l'infection à *L. monocytogenes* (AFSSA, 2000)

Espèces animales	Formes cliniques	Epidémiologie
Bovins, Ovins, Caprins	Formes cliniques	Maladie sporadique ou endémique possible, rares enzooties dans les troupeaux
Ruminants sauvages : Chevreuils, Lamas, Buffles	Formes cliniques rares	
Equins, Baudet	Formes cliniques rares	Rares cas dans les élevages
Porcins	Formes cliniques rares, porteurs sains surtout	Rares cas dans les élevages
Suidés sauvages	Formes cliniques rares, porteurs sains surtout	
Carnivores domestiques : Chiens, Chats	Formes cliniques rares	
Carnivores sauvages : Renard, Raton Laveur, Furet, Vison, Martre, Léopard, Coyote	Porteurs sains	
Lagomorphes : Lièvre, Lapin	Formes cliniques	Cas sporadiques dans les élevages
Rongeurs : Rat, Souris, Cobaye, Chinchilla, Gerbille, Lemming, Ecureuil, Campagnol, Cabiai	Formes cliniques et porteurs sains	Formes endémiques ou enzootiques
Oiseaux : Volailles : Poule, Dindon, Pintade, Canard, Oie	Formes cliniques et porteurs sains	Cas sporadiques en élevage
Pigeon, Merle, Moineau, Mouette, Freux, Corbeau Gibier à plume : Faisan, Perdrix Perroquet, Canari, Hibou des neiges, Grue	Formes cliniques très rares et porteurs sains	Cas individuels
Poissons : Carpe, Tanche, Truite, Silure	Formes cliniques	Cas sporadiques dans les étangs
Batraciens : Grenouille, Crapaud, Salamandre	Porteurs sains	
Reptiles ophidiens : Serpents	Porteurs sains	
chéloniens : Tortues	Porteurs sains	

### **1.3. *Éléments d'épidémiologie des listérioses animales***

#### **1.3.1. Prévalence de la maladie**

La surveillance de la listériose animale est différente d'un pays à l'autre au sein même de l'Union Européenne.

La listériose, maladie animale, est une maladie à déclaration obligatoire en Finlande, Suède et Allemagne (rapport européen, 1998). En France elle n'est ni une Maladie Réputée Légalement Contagieuse (MRLC) ni à Déclaration Obligatoire (DO), il est donc très difficile d'en évaluer l'incidence exacte et de faire la part des choses entre une évolution réelle de l'émergence naturelle, une meilleure prise de conscience des acteurs de la filière et une amélioration des méthodes de détection (Carlier, 2000).

Selon une enquête réalisée auprès des laboratoires d'analyses vétérinaires départementaux il semblerait que les cas de listérioses animales soient stables voire en diminution (AFSSA, 2000).

#### **1.3.2. Portage sain**

Un élément important concernant les listérioses animales doit être souligné : quelle que soit l'espèce animale hôte, la proportion de porteurs sains est très importante par rapport aux sujets présentant des symptômes. Ces porteurs asymptomatiques représentent un risque sanitaire puisqu'ils peuvent excréter des bactéries dans les fèces ou dans le lait et ainsi contaminer l'environnement et les matières premières (lait, viande).

Les travaux étudiant ce portage asymptomatique des *Listeria* chez l'animal, et par conséquent le taux de portage chez le porc, ne sont pas nombreux et sont souvent réalisés sur de très petits effectifs ce qui rend leur interprétation délicate et leur comparaison plus qu'hasardeuse. De plus les données obtenues dépendent du lieu et du type de prélèvements réalisés ainsi que de la méthode d'analyse.

Dans une étude allemande de 1995, (Weber et al.) des *Listeria monocytogenes* ont été retrouvées dans les fèces de 33% (46/133) des bovins, 8% des ovins, 8% des oiseaux, 5,9% (2/34) des porcs, 4,8% des chevaux et 1,3% des chiens. Chez les porcs, le sérotype retrouvé est du 4ab.

Chez le porc de *Listeria monocytogenes* ont été isolées des fèces et des amygdales. Les taux de portage retrouvés dans la littérature sont variables, allant de l'absence à 16% sur fèces et environ 45% sur amygdales (tableau 7).

Parmi les facteurs qui peuvent expliquer la contamination des élevages de porcs, certains auteurs mettent en avant le rôle joué par l'alimentation et notamment son origine et son humidité (Skovgaard et Morgen, 1988): les porcs nourris avec des granulés secs n'excrétaient *L. monocytogenes* dans leurs matières fécales que dans 2 % des cas, contre 25 à 50 % des porcs nourris avec des « soupes » fabriquées à la ferme. Ils attribuent cette différence à l'activité de l'eau de la « soupe » qui permettrait une multiplication de *L. monocytogenes* et conduirait à l'obtention d'une dose infectante supérieure à 105 *L. monocytogenes/g* contre moins de 10 *L. monocytogenes/g* lors de consommation de granulés secs.

L'origine de ces *L. monocytogenes* présentes dans l'aliment peut très certainement être les matières premières et notamment les céréales (Weis et Seeliger, 1975).

Tableau 7: Taux de portage de *Listeria monocytogenes* chez le porc

Pays	Nature du Prélèvement	% de positifs	Nb de positifs/total	Référence
Allemagne	fèces	5,9%	2/34	Weber et <i>al.</i> , 1995
Yougoslavie	fèces	3%	4/97	Buncic, S., 1991
	amygdales	44%	46/103	
Yougoslavie	fèces + amygdales	14% sur amygdales	5/35	Vojinovic, G., 1992
		3% sur fèces et amygdales	1/35	
Japon	fèces	0%	0/90	Mizutani et <i>al.</i> , 1990
Japon	fèces	1%	1/100	Sunaga et <i>al.</i> , 1991
Trinidad	fèces (écouvillons rectaux)	5%	7/139	Adesiyun et Krishnan, 1995
Danemark	fèces	1,7%	3/172	Skovgaard et Norrung, 1989
Suisse	fèces	0%	0/30	Gobat et Jemmi, 1990
	amygdales	0%	0/17	
Belgique	fèces	16%	4/25	Van Renterghem et <i>al.</i> , 1991

Par ailleurs il est intéressant de souligner que les sérotypes impliqués dans les infections humaines sont assez fréquemment rencontrés chez les porcs vivants. Burow et *al.* (1996), en Bavière, montrent que 16% des fèces d'animaux (bovins, ovins, porcs et volaille) sont contaminés en *Listeria monocytogenes* et que les sérotypes 4b, 1/2a et 1/2b, souvent associés aux cas humains, représentent 82% des isolats. De même une étude réalisée en France sur trente élevage de porc montre que lorsque *L. monocytogenes* est détectée elle est fréquemment du sérotype 4b (Salvat, 2000), sérotype impliqué dans les principales épidémies humaines. A l'inverse en élevage de volailles aucun sérovar 4b n'a été isolé dans les différentes enquêtes réalisées (Toquin et Colin, 1994 ; Toquin et *al.*, 1995).

## 2. Listérioses humaines

### 2.1. Physiopathologie

(Berche, 1991 ; Berche, 1999)

#### 2.1.1. Les étapes de l'infection

##### 2.1.1.1. Voie d'entrée

La principale porte d'entrée de l'infection chez l'homme se situe au niveau du tube digestif suite à l'ingestion d'un aliment contaminé (Schlech *et al.*, 1983; Farber et Peterkin, 1991). D'autres portes d'entrée ont toutefois été suspectées comme les voies aériennes supérieures ou la peau qui donnerait lieu à des formes cutanées (Gray et Killinger 1966).

La bactérie pénètre dans les cellules de la muqueuse intestinale et se multiplie dans les cellules dendritiques des Plaques de Peyer (Guzman *et al.*, 1995) échappant aux défenses immunitaires par sa position intracellulaire.

##### 2.1.1.2. Localisation au système réticulo-endothélial

Les *Listeria* se disséminent alors par voie lymphatique vers les ganglions lymphatiques régionaux, puis vers la circulation sanguine via les monocytes infectés. Elles sont rapidement phagocytées par les macrophages résidents des tissus et en particulier du foie et de la rate (North 1970) et s'y multiplient rapidement en créant des foyers de nécrose près des capillaires sanguins. Si le foie et la rate ne sont pas capables de juguler l'infection, *Listeria monocytogenes* passe dans la circulation générale occasionnant alors une phase septicémique et exposant ainsi le système nerveux et le placenta à l'atteinte infectieuse.

##### 2.1.1.3. Atteinte des organes cibles

Le système nerveux central est la cible privilégiée de *Listeria monocytogenes*. Il serait infecté par voie hématogène. La voie de pénétration de la bactérie dans les espaces sous-arachnoïdiens reste obscure mais semblerait due à la formation de foyers infectieux à la jonction des capillaires artériels et veineux dans la substance grise. Ces micro-abcès seraient alors disséminés à l'ensemble de l'encéphale puis s'étendraient par contiguïté aux méninges. La méningite serait donc consécutive à une encéphalite.

L'infection peut aussi toucher d'autres organes notamment l'utérus et l'unité foeto-placentaire.

#### 2.1.2. Réaction immunitaire

##### 2.1.2.1. Nature de la réponse

Lors de la primo-infection, les défenses immunitaires non spécifiques constituent la première vague de défense. Les cellules phagocytaires (polynucléaires neutrophiles, macrophages) sont recrutées sur le site de l'infection et activées.

Interviennent ensuite les défenses acquises spécifiques. Cette résistance est liée à l'expansion clonale de lymphocytes T dirigés contre des déterminants antigéniques

de *L. monocytogenes* et requiert la multiplication active des bactéries dans les cellules présentatrices d'antigènes.

#### 2.1.2.2. Influence du statut immunitaire

Le système immunitaire, la plupart du temps, contrôle l'infection chez les sujets immunocompétents qui feront une infection *a minima* souvent totalement asymptomatique. Ceci est probablement le scénario le plus fréquent, si l'on considère la fréquence de l'exposition à *L. monocytogenes* et la rareté de la maladie clinique.

Cependant, si l'inoculum a été massif ou chez certains sujets fragilisés, l'infection n'est pas contrôlée par le système immunitaire au cours de la phase hépatique et les bactéries sont relarguées dans la circulation sanguine. C'est à ce stade que des localisations métastatiques sont possibles, en particulier vers le placenta et le système nerveux central.

Chez l'homme les populations à risque en matière de listériose sont les individus présentant une immunosuppression :

- Les personnes présentant des défenses immunitaires réduites : femmes enceintes et leur nouveau-né, personnes âgées. Pour ce qui est de la femme enceinte, la gestation certainement sensibilise à l'infection en diminuant les défenses immunitaires, surtout au cours du 3<sup>ème</sup> trimestre de la grossesse. Ainsi, la grossesse semble favoriser la croissance bactérienne dans le foie et la rate des animaux infectés par *L. monocytogenes* ;
- Les personnes atteintes de maladies intercurrentes altérant les défenses immunitaires : SIDA, diabète, cirrhose, cancer ;
- Les personnes soumises à un traitement immunosuppresseur lors de greffe d'organe, de cancer.

#### 2.1.3. Relation dose-réponse

La taille de l'inoculum semble être un facteur primordial conditionnant l'évolution de l'infection et l'éventuel déclenchement de la maladie. Malheureusement la relation dose-réponse pour *L. monocytogenes* est encore inconnue.

Il va sans dire que la détermination de la dose infectante à l'aide de volontaires humains est éthiquement inadmissible.

Se référer à des données rétrospectives relatives à des épidémies de listérioses est délicat. En effet compte tenu de la longue incubation de la maladie et de la multiplication possible de la bactérie au froid la densité bactérienne dans l'aliment incriminé est difficile à déterminer (Goulet *et al.*, 1998).

Lors des différentes épidémies recensées dans le monde, les aliments incriminés étaient contaminés à des taux généralement supérieurs à  $10^2$  *L. monocytogenes*/g d'aliment. Cependant, ces enquêtes ne font pas le lien entre l'immuno-compétence des consommateurs, la dose ingérée et les symptômes décrits. Il n'est donc pas possible, sur la base de ces informations, de définir de manière générale une relation dose-réponse.

## 2.2. Tableaux cliniques

(Sarrut, 1975 ; Rocourt, 1990 ; Berche, 1991 ; Berche, 1999 ; Struilou et Raffi, 1997 ; Berche, 1999 ; Jacquet et al., 1999 ; AFSSA, 2000 ; Larpent, 2000)

La période d'incubation de la listériose après contamination alimentaire s'étend de un jour à plusieurs semaines (McLauchlin, 1996).

Les cas de listérioses sont regroupés en deux catégories en fonction des populations atteintes. Ainsi on distingue d'une part la listériose maternonéonatale (MN), maladie bénigne chez la femme enceinte et à l'inverse particulièrement grave chez son nouveau-né. Ces formes maternonéonatales représentent 20% des cas de listériose. D'autre part on trouve la listériose de l'enfant et de l'adulte (nonMN) qui représente 80% des cas de listériose.

### 2.2.1. La listériose materno-néonatale

Selon le moment et la voie d'infection les manifestations cliniques sont variables.

#### 2.2.1.1. La listériose de la femme enceinte

La contamination de la mère se fait par voie orale. Chez la femme enceinte, la listériose se traduit par un épisode fébrile, le plus souvent spontanément résolutif en quelques jours. Elle peut même passer inaperçue pour la mère. Cependant elle peut entraîner la contamination du fœtus ou de l'enfant lors de l'accouchement.

#### 2.2.1.2. La listériose néonatale précoce

Cette forme représente plus de 90% des cas de listériose néonatale.

*L. monocytogenes* infecte l'enfant par voie hématogène transplacentaire à la suite d'une bactériémie de la mère, entraînant mort *in utero*, avortement, fausse-couche ou accouchement prématuré selon le stade de la grossesse. La majorité des cas diagnostiqués survient après le 5<sup>ème</sup> mois. Lorsque l'infection se déclare antérieurement elle provoque des avortements spontanés.

L'infection du nouveau-né se révèle très rapidement, autour de 1 ou 2 jours post-partum. Elle se présente sous une forme septicémique qui prend le plus souvent l'allure d'une souffrance néonatale : détresse respiratoire et/ou cardiaque, hypotonicité, fièvre ou hypothermie, accompagnée parfois d'«hépato-splénomégalie». Dans une forme évoluée, elle prend la forme de la granulomatose septique infantile (*Granulomatosa infantiseptica*) avec des granulomes bactériens disséminés, atteignant la plupart des organes et s'accompagnant d'un purpura ou d'éruption cutanée maculo-papuleuse ou maculo-pustuleuse. L'anémie et la thrombopénie sont fréquentes. L'atteinte méningée accompagne très rarement ce tableau d'infection généralisée.

Dans ces formes graves, l'évolution est le plus souvent mortelle en quelques jours dans 50 à 75% des cas.

L'enfant peut aussi naître sain, mais les prélèvements gastriques ou de méconium peuvent révéler *L. monocytogenes*. Dans ce cas un traitement s'impose.

### 2.2.1.3. La listériose néonatale tardive

Cette forme de listériose aurait pour origine une contamination du fœtus par le liquide amniotique ou encore au cours du passage dans la filière génitale lors de l'accouchement.

Elle se manifeste tardivement, en moyenne 2 semaines après la naissance majoritairement sous forme d'une méningite : convulsion, détresse respiratoire voire coma.

Cette forme est rare, moins de 10 % des listérioses néonatales (Berche, 1999).

Le diagnostic est habituellement rapidement établi, expliquant la faible mortalité dans cette forme clinique. Cependant malgré le traitement des séquelles sont possibles.

### 2.2.2. Les listérioses de l'enfant et de l'adulte

S'il est vrai que la maladie revêt une fréquence et une gravité particulière chez l'immunodéprimé, le vieillard et le nouveau-né, il demeure que cet agent peut également frapper des individus en parfaite santé (Berche, 1991).

On distingue ici aussi plusieurs formes cliniques.

#### 2.2.2.1. Les listérioses invasives

Il s'agit principalement de formes nerveuses : méningite ou encéphalite, les deux pouvant être associées.

L'atteinte des méninges détermine l'apparition d'un syndrome qui ne diffère en rien de celui des autres méningites bactériennes : hyperthermie sévère, raideur de la nuque, nausées, vomissements.

Lorsque l'encéphale est atteint, des troubles nerveux apparaissent : paralysie des nerfs crâniens (paralysie oculomotrice, faciale), hémiplégie. Les complications sont essentiellement respiratoires.

Chez les sujets immuno-déprimés des formes septicémiques sont rencontrées. Elles se manifestent sous forme d'un épisode fébrile éventuellement associé à une atteinte de l'état général : fatigue, douleurs abdominales, vomissements. Elles peuvent se compliquer par des atteintes locales : pneumonie, endocardite, abcès hépatiques.

#### 2.2.2.2. Les listérioses non invasives

Certains cas de listérioses localisées peuvent survenir en dehors de toute atteinte systémique : des formes cutanées que l'on retrouve dans des professions à risque (chez les éleveurs, les vétérinaires ou les bouchers) ou encore des conjonctivites.

## 2.3. **Traitement**

(Struillou et Raffi, 1997).

*Listeria monocytogenes* est une bactérie habituellement sensible aux antibiotiques avec moins de 15% de souches résistantes (Carlier, 2000). Les résistances concernent les tétracyclines et les macrolides (Charpentier et Courvalin, 1999).

Les pénicillines (pénicillines G, ampicilline), les aminosides (gentamicyne), ainsi que l'association triméthoprime-sulfaméthoxazole sont les antibiotiques utilisés seuls ou en association.

La durée du traitement doit être de 3 à 4 semaines afin d'éviter les rechutes.

En dépit de l'antibiothérapie les séquelles neurologiques sont fréquentes (AFSSA, 2000).

## **2.4. Eléments d'épidémiologie des listérioses humaines**

### **2.4.1. Sources de contamination**

Il est aujourd'hui clairement démontré que la listériose humaine est une maladie essentiellement d'origine alimentaire. Cette hypothèse, évoquée en 1953 (Potel, 1953), a été confirmée à partir des années quatre-vingt avec la multiplication des épidémies de listérioses d'origine alimentaire.

#### **2.4.1.1. Aliments incriminés dans les épidémies de listérioses**

Les aliments impliqués dans les épidémies de listérioses sont variés, avec principalement les fromages à pâte molle au lait cru et les produits de charcuterie tels que les rillettes et les langues de porc en gelée (tableau 8). En France quatre épidémies sur sept étaient liées à ces produits de charcuterie.

#### **2.4.1.2. Aliments à risque**

Un aliment à risque est un aliment permettant la croissance de *L. monocytogenes* et consommé sans avoir été chauffé suffisamment pour détruire les *Listeria*. Les aliments tout particulièrement concernés sont les produits à conservation longue comme certains fromages et certains produits de charcuterie.

Depuis 1993, la DGCCRF réalise des contrôles microbiologiques à la distribution sur les produits alimentaires réputés à risque.

Le plan de 1993-1996 (environ 4500 prélèvements/an) révèle que 10% des produits sont contaminés par *L. monocytogenes* à la distribution (Note d'information n°1998-44 de la DGCCRF; Anonymous 1998). Cette fréquence de contamination varie selon les catégories de produits allant de 5% pour les produits laitiers à 16% pour les produits carnés. Le niveau de contamination est globalement faible puisque plus de 90% des produits contaminés le sont à moins de 100 germes/gramme, seuil considéré comme ne présentant pas de danger pour les personnes sans sensibilité spéciale par rapport à la listériose, exception faite des produits laitiers pour lesquels 40% des produits trouvés contaminés le sont à plus de 100 germes par gramme (tableau 9).

Il existe une hétérogénéité de la contamination à l'intérieur de chaque groupe de produits (tableau 10). Parmi les produits carnés, les charcuteries consommées en l'état sont beaucoup moins contaminées que la viande hachée ou la charcuterie crue hachée, respectivement 15%, 36% et 45% des produits contaminés; parmi les fromages, les fromages au lait cru sont plus fréquemment contaminés que les fromages pasteurisés.

Tableau 8: Epidémies survenues depuis 1980 en France et dans d'autres pays et aliments incriminés (au 01/07/00)

(AFSSA, 2000)

Pays	Année	Nbre de patients	Aliment incriminé	Niveau de contamination (UFC/g)
Canada	1980	41	Coleslaw (chou)	
USA	1983	49	Lait pasteurisé	
USA	1985	> 142	Fromage à pâte molle « mexican style »	10 <sup>3</sup> -10 <sup>4</sup> D
Suisse	1983-87	122	Fromage à pâte molle « Vacherin »	10 <sup>3</sup> -10 <sup>6</sup> D
Royaume-Uni, Irlande	1987-89	> 350	Pâté	10 <sup>2</sup> -10 <sup>6</sup> D
USA	1989	10	Crevettes	
Australie	1990	9	Pâté	10 <sup>3</sup> D et C
France	1992	279	Langue de porc en gelée Charcuterie à la coupe	10 <sup>4</sup> -10 <sup>6</sup> D <100
Nouvelle-Zélande	1992	2	Moules fumées	
France	1993	38	Rillettes	10 <sup>1</sup> -10 <sup>3</sup> D 10 <sup>4</sup> C
Suède	1994-95	9	Truite « gravad »	10 <sup>2</sup> -10 <sup>6</sup> D
France	1995	36	Fromage à pâte molle « Brie »	
France	1997	14	Fromage à pâte molle « Livarot » « Pont l'Evêque »	
France	1999	3	Fromage à pâte molle type « Epoisses »	
USA	1998-99	101	Hot Dog Deli meat	< 0, 3 D et C
Finlande	1999	18	Beurre	<10 P 10 <sup>3</sup> C et 10 <sup>6</sup> C
France	1999	10	Rillettes	
France	1999-2000	32	Langue de porc en gelée Charcuterie	

P : prélèvements à la production, produit non déconditionné

D : prélèvements à la distribution, produit non déconditionné

C : prélèvements chez le consommateur, produit déconditionné

Tableau 9: Niveau de contamination à la distribution par catégorie d'aliments – Plan de contrôle DGCCRF 1993-96

	Pourcentage du nombre total de prélèvements						Pourcentage du nombre de prélèvements contaminés				
	absence	<100	10 <sup>2</sup> -10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup> -10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup> -10 <sup>5</sup>	>10 <sup>5</sup>	<100	10 <sup>2</sup> -10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup> -10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup> -10 <sup>5</sup>	>10 <sup>5</sup>
Produits carnés	84,0	14,8	0,8	0,3	0,1	0,1	92,7	4,9	1,8	0,3	0,3
Produits laitiers	95,3	2,9	0,7	0,5	0,3	0,2	62,7	15,7	11,4	6,0	4,2
Pâtisseries	95,7	4,0	0,3	0,1	0	0	91,8	6,1	2,0	0	0
Végétaux	95,5	4,2	0,2	0,1	0	0	93,0	4,9	1,4	0,7	0
Produits de la mer	89,8	9,7	0,4	0,1	0	0	94,9	3,7	1,1	0,4	0

Tableau 10: Différences de contamination dans chaque catégorie d'aliments - Plan de contrôle DGCCRF 1993-96

Type de produit	Pourcentage de produits contaminés
<b>Produits carnés</b>	<b>16%</b>
<i>charcuterie crue hachée</i>	45%
<i>viande hachée</i>	36%
<i>charcuterie consommée en l'état</i>	15%
<b>Produits de la mer</b>	<b>10%</b>
<i>saurisserie fumée</i>	16%
<b>Produits laitiers</b>	<b>5%</b>
<i>Fromages au lait cru</i>	8%
<i>croûte fleuri</i>	14%
<i>croûte lavée</i>	10%
<i>Fromages au lait pasteurisé</i>	3%
<i>croûte fleurie</i>	4%
<i>croûte lavée</i>	5%

Les contrôles de la DGCCRF réalisés de 1997 à 2001 (environ 1000 échantillons/an sur 10 catégories de produits) (tableau 11) révèlent une amélioration régulière de la situation. Sur l'ensemble de cette période 6% des échantillons (385/6135) sont contaminés par *Listeria monocytogenes*. Lorsque les produits sont contaminés, ils le sont en très grande majorité à moins de 100 germes par gramme (DGCCRF, 2003).

Tableau 11: Niveau de contamination à la distribution par catégories d'aliments  
Contrôles DGCCRF de 1993 à 2001

	% d'échantillons contaminés								
	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001
Charcuteries Cuites (langues et têtes)	19	12	13	17	13	15	13	7	6
Charcuteries cuites (intestin et sang)	14	14	6	9	7	10	7	7	6
Rillettes	13	10	12	7	7	10	3	6	3
Fromages pâte molle croûte fleurie crus	16	17	9	13	10	7	2	3	1
Fromages pâte molle croûte lavée crus	12	11	9	8	5	4	7	5	5
Végétaux crus ensaucés réfrigérés	3	5	1	1	1	0	3	2	2
Salades composées	8	6	11	6	9	5	3	4	4
Graines germées réfrigérés	16	22	5	0	0	12	3	6	6
Saurisserie	18	15	24	19	26	14	12	7	10
Coquillages vivants	-	-	4	2	4	7	4	4	3
Total	13	11	10	8	9	8	6	5	5

## 2.4.2. Prévalence de la maladie

### 2.4.2.1. Généralités

La listériose évolue essentiellement sous forme de cas sporadiques pour lesquels il est difficile de déterminer l'origine. A ces cas sporadiques viennent se superposer des bouffées épidémiques voire des épidémies principalement provoquées par une souche unique provenant d'une source unique de contamination. Bien que le nombre de cas sporadiques soit nettement supérieur à celui des épidémies, l'impact médiatique de ces dernières est particulièrement important.

Les cas de listériose sont exclusivement observés dans les pays industrialisés. Une cinquantaine d'épidémies de listériose a été répertoriée depuis les années soixante avec une multiplication des cas depuis les années quatre-vingt, c'est pour cela que l'on peut dire que la listériose est une maladie d'émergence récente.

Les facteurs d'émergence de la listériose sont d'une part l'industrialisation de l'agroalimentaire avec notamment le développement de la chaîne du froid et d'autre part l'augmentation de la population à risque, personnes âgées et immunodéprimées.

## 2.4.2.2. Evolution des cas en France

### 2.4.2.2.1. Moyens de surveillance

(Goulet et *al.*, 2001a)

La listériose humaine est une maladie à déclaration obligatoire (DO) depuis 1998 (Décret n°98-69 du 13 mars 1998), ce qui a rendu sa surveillance, recensement des cas et identification des aliments en cause, nettement plus efficace.

Dès que le diagnostic de listériose humaine est posé, par l'isolement de la bactérie chez le patient, le cas est signalé à la Direction Départementale des Affaires Sanitaires et Sociales (DDASS). Une fiche de déclaration complétée par le médecin clinicien est envoyée à la DDASS qui la transmet ensuite à l'Institut de Veille Sanitaire (InVS). La DDASS est également chargée de remplir un questionnaire concernant les habitudes alimentaires du patient.

Les souches de *Listeria monocytogenes* isolées des patients doivent être envoyées au Centre National de Référence (CNR) des *Listeria*, à l'Institut Pasteur de Lille, pour typage. Les souches sont caractérisées selon le schéma suivant : confirmation de l'identification par des tests biochimiques, détermination du sérovar et du lysovar pour toutes les souches de *Listeria monocytogenes*. L'analyse des profils de macrorestriction d'ADN est utilisée lors de situations particulières (signalement et alertes) afin de comparer précisément les souches entre elles ou de comparer des souches d'origine humaine avec des souches d'origine alimentaire.

Lorsque le CNR détecte une augmentation du nombre de cas ou encore des cas dus à des souches similaires il informe les membres de la « cellule *Listeria* » chargée de la coordination des investigations et des actions. Cette « cellule *Listeria* » est constituée de représentants de la Direction Générale de la Santé, de la Direction Générale de l'Alimentation, de la Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes, de l'InVS et du CNR. L'InVS analyse les informations concernant les patients (fiches de DO et questionnaires alimentaires) et décide ou non de passer en phase d'alerte. Lors d'alerte, les différents partenaires de la cellule de coordination décident des investigations à entreprendre afin d'identifier un éventuel aliment commun à l'origine des cas afin d'éviter de nouveaux cas par la mise en oeuvre de mesures appropriées.

### 2.4.2.2.2. Evolution de la prévalence

En 1999, 270 cas de listériose humaine ont été signalés en France soit une incidence de 4,4 cas par million d'habitants. La listériose humaine est donc une maladie rare comparée à d'autres toxi-infections alimentaires telles que les Salmonelloses par exemple pour lesquelles plus de 200 cas par million d'habitant sont recensés (Grimont et Bouvet, 2003).

En plus d'être rare cette maladie est en nette diminution. Entre 1987 et 1997 le nombre total de cas de listériose a été divisé par 3 environ. Cette diminution a été particulièrement importante chez les femmes enceintes et les personnes jeunes sans terrains favorisant, pour lesquelles les nombres de cas ont été respectivement divisés par 7 et 6. Chez les personnes de plus de 65 ans et les personnes immunodéprimées la diminution est moins marquée le nombre de cas a été respectivement divisé par 3 et 1,6 (Goulet et *al.*, 2001b).

#### 2.4.2.2.3. Impact des mesures de contrôle

(Goulet et *al.*, 2001b)

Les premières mesures de contrôle des aliments pour la listériose, en France, datent de 1986 et ont concerné dans un premier temps les établissements exportateurs de fromages vers les USA, puis en 1988 les établissements ayant une production de fromage nationale. L'épidémie de 1992 (279 cas) liée à la consommation de langue de porc en gelée a été l'occasion de diffuser des recommandations alimentaires de prévention auprès des personnes à risque, notamment les femmes enceintes (tableau 12), de renforcer les règles d'hygiène au niveau de la distribution et d'élargir les mesures de contrôle aux produits carnés, puis en 1993 à tous les produits alimentaires pouvant être contaminés.

Les mesures de contrôle mise en place dans les industries sont l'HACCP qui permet l'analyse des dangers et la maîtrise des points critiques aux différentes étapes de la chaîne alimentaire, l'application de Bonnes Pratiques Hygiéniques de fabrication, la réalisation d'auto-contrôles microbiologiques sur les produits ainsi que la réalisation de contrôles microbiologiques sur les aliments à la distribution par la DGCCRF.

Les données disponibles sur l'incidence de la listériose en France sont en faveur d'une relation forte entre la diminution du nombre de cas et les mesures de contrôles instaurées dès 1986 dans l'industrie agroalimentaire. La diminution de l'incidence de la listériose est particulièrement importante chez les femmes enceintes, concernées par les recommandations alimentaires diffusées dès 1992, et pour la population n'ayant pas de facteur de risque reconnu, non concernée par les recommandations alimentaires de prévention préconisées par la DGS, et dont le mode d'acquisition de la listériose le plus probable est l'ingestion de produits très contaminés. La diminution est beaucoup moins importante chez les sujets immunodéprimés qui peuvent être contaminés par des doses plus faibles.

Ces résultats suggèrent que les mesures à la production ont été plus efficaces pour diminuer la circulation d'aliments fortement contaminés que pour réduire la circulation des aliments faiblement contaminés qui sont toujours présents à la distribution comme l'indique les plans de surveillance de la DGCCRF.

#### 2.4.3. Sérotypes impliqués

Les sérotypes 4b, 1/2a et 1/2b représentent 90 à 95% des souches à l'origine de cas humains de listériose recensés par le CNR. Environ 50% des souches sont des 4b et 45% des 1/2a ou 1/2b. Cette prédominance du sérotype 4b est quasi systématique depuis 1987 (Goulet et *al.*, 2000 ; Jacquet et *al.*, 1999).

En ce qui concerne les épidémies invasives recensées en France, huit jusqu' en 2000, toutes ont pour origine une souche de sérotype 4b (Martin, 2001).

A l'inverse peu de souches isolées des aliments sont du sérotype 4b : en 1998 le sérotype 4b ne représente que 12% des souches alimentaires de *Listeria*. Cette différence de distribution des sérovars entre les souches d'origine humaines et les souches isolées d'aliments est classiquement observée sans qu'aucune explication ne puisse être apportée dans l'état actuel des connaissances (Jacquet et *al.*, 1999).

#### 2.4.4. Portage sain

La plupart des études récentes révèlent un taux de portage dans les selles d'environ 5% (AFSSA, 2000).

## Tableau 12: Précautions à prendre pour la prévention de la listériose chez les femmes enceintes, les patients immuno-déprimés et les personnes âgées

(Source : Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire 1995 n°23)

### •**ALIMENTS A EVITER**

- Eviter la consommation de fromages à pâte molle au lait cru ;
- Enlever la croûte des fromages avant consommation ;
- Eviter la consommation de fromages vendus râpés ;
- Eviter la consommation de poissons fumés ;
- Eviter la consommation de graines germées crues (soja, luzerne, (alfafa) ...) ;
- Eviter la consommation de produits de charcuterie cuite consommés en l'état ex : pâté, rillettes, produits en gelée, jambon cuit. Si achetés, préférer les produits préemballés et les consommer rapidement après leur achat ;
- Eviter la consommation de produits de charcuterie crue consommés en l'état - Les faire cuire avant consommation, ex : lardons, bacon, jambon cru ;
- Eviter la consommation de produits achetés au rayon traiteur ;
- Eviter la consommation de coquillages crus, surimi, tarama.

### •**REGLES D'HYGIENE A RESPECTER**

- Cuire soigneusement les aliments crus d'origine animale (viandes, poissons) ; en particulier le steak haché doit être cuit à cœur ;
- Laver soigneusement les légumes crus et les herbes aromatiques ;
- Conserver les aliments crus (viande, légumes etc...) séparément des aliments cuits ou prêts à être consommés ;
- Après la manipulation d'aliments non cuits se laver les mains et nettoyer les ustensiles de cuisine qui ont été en contact avec ces aliments ;
- Nettoyer fréquemment et désinfecter ensuite avec de l'eau javellisée votre réfrigérateur ;
- Les restes alimentaires et les plats cuisinés doivent être réchauffés soigneusement avant consommation immédiate.

# Chapitre III : *Listeria monocytogenes* dans la filière porcine

## 1. Généralités

La filière porcine a, à plusieurs reprises, été incriminée lors d'épidémies de listériose humaine. En effet les épidémies de 1992 et 1993 ont révélé l'implication de produits de charcuterie, langue en gelée et rillettes, dans la transmission de la listériose, maladie jusqu'alors communément associée aux produits laitiers.

*Listeria monocytogenes* est donc aujourd'hui un réel problème pour les industriels de la filière porcine, comme pour beaucoup des industriels de l'agroalimentaire. Du fait de ces particularités physiologiques, elle est capable de contaminer les aliments à tous les stades de la chaîne alimentaire, de la production jusque chez le consommateur, et de continuer à se multiplier dans ces aliments durant toute leur durée de conservation.

## 2. Etapes de l'abattage, du ressuage et de la découpe de porc

### 2.1. L'abattage des porcs

L'abattage constitue une étape fondamentale dans la maîtrise de la qualité bactériologique de la viande de porc.

Outre l'apport de micro-organismes par l'animal lui-même, les conditions d'abattage : transport, stabulation, process d'abattage, process de réfrigération, hygiène des locaux et du matériel, hygiène du personnel, vont conditionner la contamination finale du produit.

La figure 2 présente les principales étapes de l'abattage de porc.

#### 2.1.1. Transport et stabulation

Les porcs à l'issue du transport sont stockés dans des cases, dans les porcheries d'attente à l'abattoir, généralement groupés selon leur élevage d'origine.

Cette phase d'attente avant abattage est censée permettre aux porcs d'éliminer le stress lié au transport et ainsi obtenir une bonne qualité technologique de la viande.

Sur le plan de la qualité hygiénique, au cours de l'attente les porcs peuvent subir des inter-contaminations via les locaux, les autres animaux etc...

#### 2.1.2. Préparation externe des carcasses

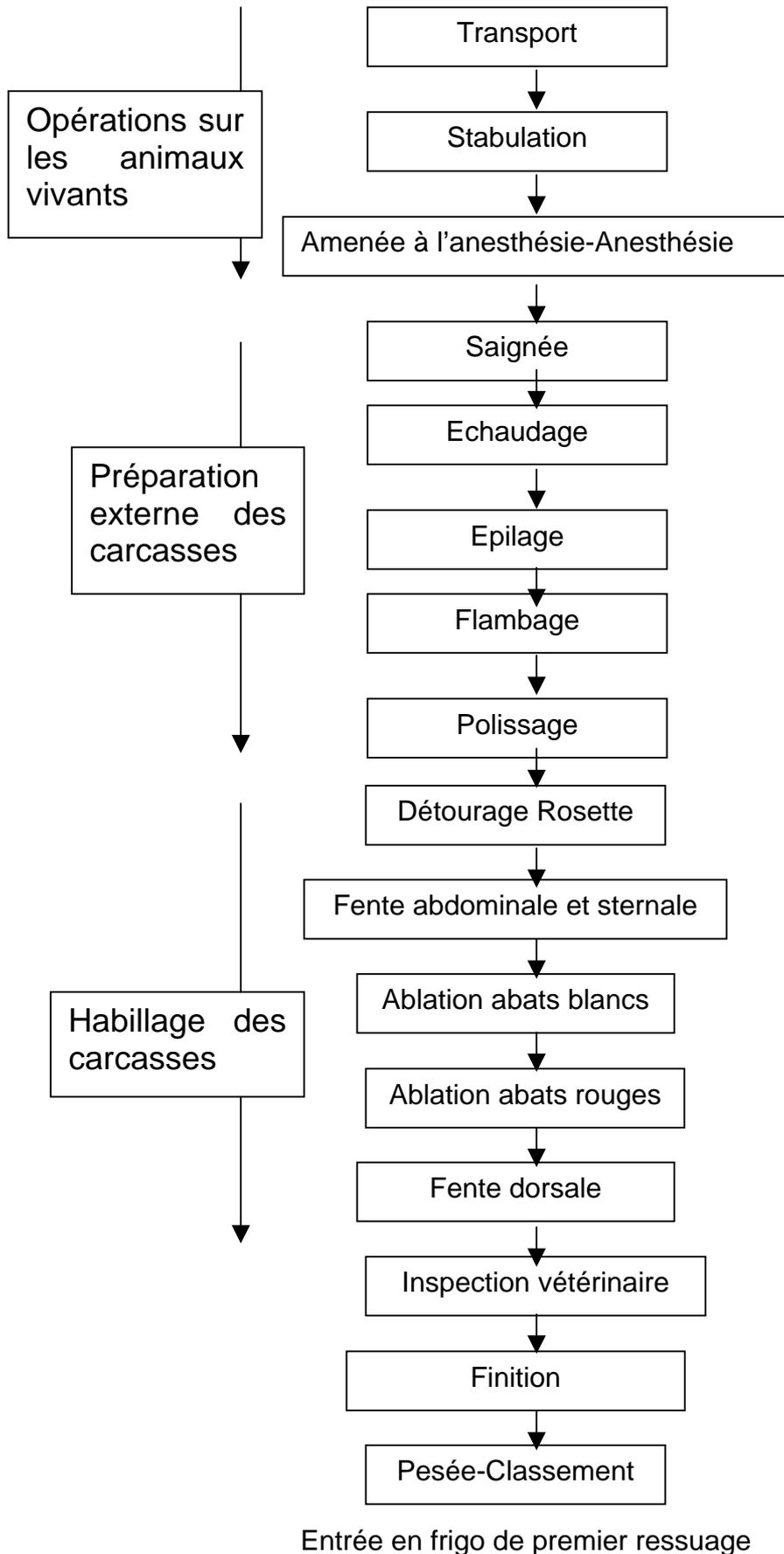
##### 2.1.2.1. Anesthésie et saignée

Les porcs sont amenés à l'anesthésie par lots, dans des couloirs.

Les animaux sont étourdis soit par des systèmes électriques, manuels ou automatiques, c'est l'électronarcose, soit par inhalation de CO<sub>2</sub> dans une fosse.

La saignée doit suivre immédiatement l'anesthésie. Elle est réalisée horizontalement ou verticalement.

Figure 2: Principales étapes de l'abattage des porcs



#### 2.1.2.2. Echaudage

A l'inverse des bovins, les porcs ne sont pas dépouillés. L'échaudage consiste à passer les carcasses dans de l'eau chaude (60-63°C) ou sous des jets de vapeurs pendant quelques minutes (6-8 minutes) afin d'attendrir la peau et ainsi faciliter l'ablation ultérieure des soies et onglons.

L'échaudage peut se faire :

- horizontalement par immersion,
- verticalement par aspersion d'eau,
- verticalement par aspersion de vapeur d'eau.

L'eau de l'échaudage est rapidement souillée par des matières organiques du fait de son faible taux de renouvellement et des cadences d'abattage parfois très élevées (jusqu'à environ 600-700 porcs/heure). Cependant une température homogène de l'eau et au moins égale à 56-57°C permet d'éviter les risques de contamination bactérienne des carcasses (Corrégé, 1997).

#### 2.1.2.3. Épilage

Il consiste en un passage, durant environ 1 minute, des carcasses dans une épileuse qui à l'aide de lattes en rotation élimine les soies et les onglons.

Cette phase est susceptible d'augmenter la contamination bactérienne des carcasses d'une part parce que l'action mécanique peut entraîner l'extériorisation des fèces qui souillent alors les carcasses et d'autre part parce que l'épileuse est difficile d'accès et donc souvent mal nettoyée-désinfectée.

#### 2.1.2.4. Flambage-polissage

Les carcasses épilées passent dans une succession de fours et de flagelleuses.

Les fours permettent de « griller » les dernières soies restant sur les carcasses ainsi que de sécher ces dernières. Leur effet bactéricide a été largement démontré (Borch et al., 1996 ; de Montzey et al., 2001).

Les flagelleuses servent à polir les carcasses en éliminant les dernières soies. Elles peuvent occasionner une recontamination des carcasses ce qui annule en partie l'effet favorable du flambage. Ces recontaminations sont dues au fait que les flagelleuses sont difficiles à nettoyer et désinfecter compte tenu de leur conception (Borch et al., 1996).

Du point de vue bactériologique terminer les étapes de préparation externe des carcasses par un ultime flambage permet d'obtenir des carcasses moins contaminées à l'entrée sur la file d'habillage (de Montzey et al., 2001).

#### 2.1.3. Habillage des carcasses

L'habillage des carcasses correspond à la préparation interne.

L'éviscération consiste en l'ablation des viscères abdominaux et thoraciques sauf les reins. C'est la phase la plus délicate du processus d'abattage du point de vue de la contamination bactérienne qu'elle peut occasionner.

Elle débute par le détournement du rectum au couteau ou à l'aide d'un cylindre tranchant rotatif pneumatique. Au cours de cette étape des fèces présents dans le rectum

peuvent venir souiller la carcasse. Pour y remédier le rectum peut être introduit dans un sac plastique. Cette mesure hygiénique est pratiquée depuis longtemps dans les abattoirs danois, suédois afin de limiter la contamination des carcasses par les Salmonelles.

Ensuite l'abdomen est fendu et les abats blancs (estomacs et intestins) sont évacués dans des balancelles. Cette étape nécessite une parfaite maîtrise du geste par les opérateurs afin d'éviter toute perforation des intestins qui occasionnerait alors une souillure et une contamination bactérienne importante de la carcasse. Afin de limiter les inter-contaminations le matériel des postes d'éviscération doit être régulièrement « désinfectés » dans les stérilisateur contenant de l'eau à 82°C.

Le sternum est fendu ou scié et la fressure (foie, cœur, poumons) mise sur balancelles.

La fente dorsale permet d'obtenir deux demi-carcasses. Elle est réalisée à la feuille (sorte de hache), à la scie, ou à la fendeuse automatique. Cette étape peut occasionner des inter-contaminations et la formation de « miettes » d'os. Le risque de contamination bactérienne est d'autant plus important que les abcès vertébraux sont relativement fréquents dans l'espèce porcine.

Ensuite les carcasses sont inspectées par les services vétérinaires.

Les opérations de finitions (levées des pannes, ablation des reins...) sont réalisées.

Les carcasses sont alors pesées. Leur teneur en viande maigre (TVM) est mesurée.

#### 2.1.4. Réfrigération

L'abattage des carcasses est réalisé à température ambiante. En fin de ligne d'abattage une carcasse de porc est encore à environ 30°C en surface et 38-40°C en profondeur. Ces températures sont optimales pour la croissance de la majorité des bactéries contaminant les carcasses.

Le but de la réfrigération est donc d'abaisser le plus rapidement possible la température des carcasses à un niveau suffisamment bas pour arrêter ou du moins ralentir le développement microbien.

Deux points de référence sont définis en terme de réfrigération (Certiviande, 1995):

- obtention d'une température à cœur de 20°C après 6 heures de réfrigération,
- obtention d'une température à cœur de 7°C après 24 heures de réfrigération.

En dessous de 7°C la multiplication de la plupart des germes pathogènes (*Salmonelles*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum*) est arrêtée. Elle n'est pas arrêtée mais quand même fortement ralentie pour *Listeria monocytogenes*.

La phase de réfrigération des carcasses comprend deux étapes :

- le premier ressuage : phase de refroidissement rapide des carcasses après abattage
- le stockage

Le premier ressuage peut être réalisé selon trois techniques différentes (Corrégé, 1994):

- la réfrigération lente : ressuage des carcasses à une température de 0°C, une humidité relative de 95%, une vitesse d'air de 0,5m/s pendant 6 à 8 heures ;
- la réfrigération rapide en froid négatif : les carcasses circulent dans un tunnel pendant 1 à 2 heures. Les carcasses subissent d'abord un froid négatif (jusqu'à - 25°C) avec une grande vitesse d'air (2 à 3 m/s). Puis la température est ramenée aux alentours de 0°C avec une vitesse d'air réduite ;
- la réfrigération rapide par brumisation. Les carcasses circulent pendant 3 à 7 heures dans un tunnel à température positive proche de 0°C et de fines gouttelettes d'eau sont pulvérisées sur les carcasses dans des « cabines ».

La deuxième étape, le stockage, se réalise de façon statique, dans des frigos à environ 2°C pendant plusieurs heures jusqu'à expédition ou découpe.

La contamination environnementale des locaux de réfrigération : cabines, évaporateurs, parois, a été fréquemment décrite comme vecteur de contamination des produits par *Listeria monocytogenes* (van den Elzen et Snijders, 1993 ; Corrége, 1997 ; Giovannacci, 1999).

## **2.2. La découpe de porc**

Les opérations de découpe sont effectuées dans des salles dont la température ne doit pas dépasser 12°C mais dont l'optimum est 7°C (Certiviande, 1995).

Les opérations de découpe se scindent en deux :

- la découpe primaire permettant d'obtenir les quatre pièces principales brutes : jambon, longe, poitrine, épaule-gorge,
- la découpe secondaire qui aboutit aux pièces découennées, désossées, et éventuellement dénervées et dégraissées.

Les pièces sont convoyées sur des tapis et manipulées sur des tables de découpe en polyéthylène puis mises en bac ou accrochées sur des balancelles, des barres etc... pour être stockées en frigos.

Les produits sortant de l'atelier de découpe sont divers. Ce sont soit des produits destinés directement au consommateur sans modification soit des pièces qui subiront une préparation avant commercialisation chez un boucher ou dans un atelier de charcuterie salaison.

## **3. Evolution de la contamination en *Listeria monocytogenes* en abattage et découpe de porc**

### **3.1. Animaux vivants**

Sur les porcs vivants des *Listeria monocytogenes* ont été retrouvées dans les fèces, sur les amygdales et sur la couenne.

Les rares études réalisées sur ces animaux vivants montrent un niveau de contamination variable mais en moyenne plutôt faible. Dans la majorité des études 0% à 5% des porcs sont détectés porteurs au niveau digestif (cf. Chapitre II 1.3.2).

En France, Corrége (1997) a montré que, sur 109 lots de 20 porcs, prélevés par chiffonnage de la couenne au niveau des lombaires lors de l'attente avant abattage, 27,5% étaient contaminés par *Listeria monocytogenes*.

Rappelons un point important qui est la présence sur les porcs vivants du serovar 4b, à l'origine des principales épidémies humaines.

### 3.2. A l'abattoir

Le niveau de contamination des carcasses est variable selon les études en particulier du fait des modalités de prélèvement (tableau 13).

Tableau 13 : Pourcentage de carcasses de porc contaminés en *L. monocytogenes*

Pays	Type de Prélèvement	Nb de prélèvement /carcasse	% de positifs (nb échantillon)	Référence
Finlande	Chiffonnette sur couenne	1	12% (50)	Autio et al., 2000
Trinidad	Ecouvillon sur couenne et viande	2 de 100 cm <sup>2</sup>	1,9% (155)	Adesiyun et Krishnan, 1995
Pays-Bas	Chiffonnette	1 de 400 cm <sup>2</sup>	2% sur viande (45) 7% sur couenne (45)	Van den Elzen et Snijders, 1993
Suisse	Ecouvillon de couenne en frigo	1 de 16 cm <sup>2</sup>	6,5% (92)	Gobat et Jemmi, 1990
France	Excision de couenne ou de viande en frigo	1 de 25 cm <sup>2</sup>	6% (691)	Corrégé, 1997
France	Excision de couenne et viande en frigo	8 de 25 cm <sup>2</sup> (longe, épaule, gorge, jambon, poitrine sur couenne et jambon, poitrine, hampe sur viande)	33% (96)	Corrégé, 1997.

Dans la majorité des études la contamination en *Listeria monocytogenes* des carcasses est relativement faible de 2 à 12%. Notons que ces résultats sont obtenus en ne réalisant qu'un prélèvement par carcasse en plus généralement avec une méthode non destructive (chiffonnage, écouvillon) donc moins sensible à surface équivalente qu'une méthode destructive (ex : excision).

Dans une étude (Corrégé, 1997) où 8 sites par carcasses sont prélevés, par excision, 33% des carcasses sont détectées contaminées. Ce pourcentage peut paraître élevé mais les trois quart des carcasses ne sont contaminées que sur un des huit sites prélevés. De plus tous les dénombrements sont négatifs. Les *Listeria monocytogenes* sont donc souvent présentes sur les carcasses mais en faible nombre.

L'origine de la contamination des carcasses semble être en grande partie l'étape de réfrigération. Corrége (1997) a réalisé dans quatre abattoirs un suivi de la contamination des carcasses au cours des opérations d'abattage et de réfrigération. A la saigné, 27,5% des lots sont contaminés en fin de chaîne 31,5% des lots sont contaminés et en sortie de ressuage 69,4% des lots sont contaminés. Globalement les opérations d'abattage n'influencent donc pas la contamination des carcasses en *Listeria monocytogenes*. Par contre la phase de réfrigération entraîne une augmentation importante de cette contamination. Cet élément s'explique en partie par la capacité du germe à continuer de se développer aux températures de réfrigération.

### 3.3. En découpe

Plusieurs études ont mis en évidence une augmentation massive de la contamination des produits par *Listeria monocytogenes* au cours de opérations de découpe (Van den Elzen et Snijders, 1993 ; Corrége, 1997) même pour ceux issus de carcasses peu contaminées.

Dans certaines études jusqu'à près de 60% des pièces de découpe sont détectées contaminées (tableau 14).

Cependant, comme pour les carcasses, même si la présence de *Listeria monocytogenes* est fréquente sur les pièces de découpe le nombre est faible, les dénombrement sont rarement positifs (Corrége, 1997 ; Corrége et Le Roux, 1996).

Tableau 14 : Pourcentages de pièces de découpe de porc contaminées par *L. monocytogenes*

Pièces	Nature du prélèvement	% de positifs (nb d'échantillons)	Source
Découpe primaire et secondaire	Excision de couenne ou viande sur 25 cm <sup>2</sup>	58,4% (329)	Corrége, 1997
Jambon brut	Excision de 15 cm <sup>2</sup>	27% (44)	Van den Elzen et Snijders, 1993
Poitrine brute		11% (44)	
Epaule brute		36% (44)	
Gorge		36% (44)	

### 3.4. Sources de contamination : Rôle de l'environnement industriel

Au cours des opérations d'abattage, de réfrigération et de découpe l'amplification de la contamination des produits par *Listeria monocytogenes* est due aux manipulations par le personnel, aux éventuels contacts des produits entre eux mais aussi aux contacts des produits avec un environnement contaminé.

En effet en cours d'activité les locaux, le matériel : couteau, tables, machines, sont souvent contaminés (Van den Elzen et Snijders, 1993 ; Autio et al., 2000) . Les résultats d'enquêtes menées par l'Institut Technique du Porc (ITP) (Corrége, 1997) présentées dans le tableau 15, montrent la forte contamination des locaux d'abattage, de ressuage et de découpe qui augmente au cours de l'activité et persiste en partie après les opérations de nettoyage-désinfection.

Tableau 15 : Pourcentages de sites environnementaux contaminés par *L. monocytogenes*  
(Corrégé, 1997)

Lieux	Pendant l'activité (après 6 heures d'activité)	Après nettoyage-désinfection
Abattoir (ressuage inclus)	40%	10%
Ressuage	57,1%	30%
Salle de découpe primaire	63,5%	29,4%
Salle de découpe secondaire	87,1%	14,3%
Frigos (carcasses et pièces)	37,5%	21,4%

L'étude génotypique des souches de *Listeria monocytogenes* isolées des produits de porc et de l'environnement industriel a permis de mettre en évidence des contaminations croisées entre les produits et l'environnement (Giovannacci, 1999).

De plus une contamination endémique des abattoirs, salles de ressuage et salles de découpe a été démontrée. Le suivi réalisé dans plusieurs entreprises agroalimentaires pendant plusieurs mois a montré que les mêmes génotypes obtenus par macro-restriction et électrophorèse à champ-pulsé (RFLP-PFGE) pouvaient être identifiés même à plusieurs mois d'intervalle en cours de production comme après les opérations de nettoyage et de désinfection (Giovannacci.,1999).

Plus que l'entrée régulière d'animaux contaminés, c'est l'absence ou l'inefficacité des opérations de nettoyage et de désinfection de certaines zones qui favoriserait l'implantation des *Listeria monocytogenes* à l'origine de la contamination des produits de porc.

### **3.5. Sérotypes isolés**

Le sérotype 1/2a est prédominant dans la filière porcine, sur les produits comme dans l'environnement. C'est le cas également pour toutes les filières animales sauf la filière lait cru où le sérotype 4b est retrouvé plus fréquemment (Giovannacci, 1999 ; Jay, 1996).

Le sérotypes 1/2c a également été isolés dans la filière porcine. Des clones \* liés aux sérotypes 1/2b et 4b ont été récemment identifiés dans la filière mais sont peu représentés (Giovannacci, 2002).

## Chapitre IV : Réglementation

### 1. Bases épidémiologiques

Les données concernant la relation dose-réponse pour *Listeria monocytogenes* sont parcellaires. La notion actuelle de seuil admissible découle des dénombrements recueillis lors des épisodes épidémiques.

Comme les aliments mis en cause en cas d'épidémie étaient, dans un nombre important de cas, contaminés entre 100 à 1000 *L. monocytogenes/g*, de nombreux pays, dont la France, ont considéré qu'un aliment devenait potentiellement dangereux quand la concentration bactérienne dépassait 100 *L. monocytogenes/g*. Cependant, on ne peut exclure que, pour certaines populations à risque et dans certaines conditions, des contaminations plus faibles puissent déclencher une listériose. Par ailleurs le long délai d'incubation de la maladie fait que les quantités retrouvées au moment des investigations ne sont pas celles qui ont causé la maladie, elles tendraient à être supérieures du fait de la conservation et de l'aptitude de croissance à basse température de *L. monocytogenes*.

Les techniques de dénombrement sont par ailleurs techniquement et statistiquement satisfaisantes pour estimer des populations bactériennes au-delà de 100 bactéries/g.

La densité critique du point de vue sanitaire de 100 *L. monocytogenes/g* à la consommation a donc été proposée par le Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France (CSHPF), en 1992. Il n'existe pas actuellement de données suffisantes conduisant à proposer sa modification.

### 2. Réglementation française

Au plan national et quelles que soient les denrées alimentaires, la note de service DGAL/SDHA/N98/N°8088, du 12 mai 1998 édicte les instructions aux services de contrôle dans le cadre de la gestion des non conformités. Cette dernière, dans son annexe 4, indique clairement que, «compte tenu de la gravité de la listériose humaine, le critère cible, tant à la production qu'à la distribution, reste bien l'absence de *L. monocytogenes* dans 25 grammes de produits».

Toutefois, ce texte admet une tolérance pour certaines productions, pour lesquelles ce critère, malgré l'application de bonnes pratiques hygiéniques, apparaît difficile à atteindre. Cette tolérance n'est acceptable que dans le cas où les études de vieillissement réalisées sur ces produits démontrent qu'à la date limite de consommation, le nombre de *L. monocytogenes* demeure inférieur à 100 unités formant colonies par gramme.

Les critères selon les catégories de produits sont présentés au tableau 16.

A la suite d'un avis de l'AFSSA (14 janvier 2000) les critères s'appliquant aux produits de charcuterie des catégories C1 et C2 tels que les rillettes, les langues de porc en gelée ont été rendus plus sévères. Ces produits doivent maintenant respecter à la production les mêmes critères que la catégorie C3 soit absence dans 25 grammes sans tolérance.

Tableau 16 : Classement des aliments et seuils critiques de l'annexe 4 de la note de service DGAI/SDHA/N98/N°8088 modifiée par la circulaire n°0125 du 19/01/00.

	Recherche de <i>L. monocytogenes</i> dans 25 g (sur 5 unités)	Dénombrement (sur 5 unités)	Critères applicables à la PRODUCTION	Critères applicables à la DISTRIBUTION
Catégorie A : Aliments spécialement destinés à la consommation par des populations à risque (aliments pour nourrissons, aliments spéciaux à usage médical)	Oui	Inutile	Absence dans 25g	Absence dans 25g
Catégorie B : Aliments ayant fait l'objet d'un traitement assainissant dans leur conditionnement définitif ou conditionnés aseptiquement après traitement	Oui	Inutile	Absence dans 25g	Absence dans 25g
Catégorie C1 : Produits crus ou ayant subi un traitement insuffisant pour les assainir, à l'exception des produits à base de lait, des langues de porc en gelée et rillettes qu'ils soient consommés crus ou après cuisson	Oui	Oui	Absence dans 25g; tolérance possible si les tests ont montré que le critère à la distribution était respecté	m=100/g, avec n=5 et c=0: tout résultat sur une unité supérieur à 100 <i>L. monocytogenes</i> /g conduit à conclure à un résultat «non satisfaisant» pour l'échantillon(1)
Catégorie C2 : Produits ayant subi un traitement assainissant puis manipulés avant conditionnement, à l'exception des produits à base de lait, des langues de porc en gelée et des rillettes	Oui	Oui	Absence dans 25g; tolérance possible si les tests ont montré que le critère à la distribution était respecté	m=100/g, avec n=5 et c=0: tout résultat sur une unité supérieur à 100 <i>L. monocytogenes</i> /g conduit à conclure à un résultat «non satisfaisant» pour l'échantillon(1)
Catégorie C3 : Produits à base de lait autres que ceux visés aux points A et B, langues de porc en gelée et rillettes	Oui	Utile	Absence dans 25g ou dans 1g pour certains fromages (Arrêté du 30 mars 1994)	m=100/g, avec n=5 et c=0: tout résultat sur une unité supérieur à 100 <i>L. monocytogenes</i> /g conduit à conclure à un résultat «non satisfaisant» pour l'échantillon(1)

(1) La limite de 100 *L. monocytogenes* par gramme correspond à une tolérance qui n'est acceptable que dans le cas où le producteur de la denrée a fait réaliser une « étude de vieillissement » prouvant qu'à la DLC la denrée respecte le critère fixé dans la colonne distribution.

Un récent avis de l'AFSSA définit en terme de risque *Listeria* une nouvelle classification des aliments selon leur aptitude à permettre la croissance du germe, les phases technologiques de recontamination ainsi que selon le mode de conservation prenant notamment en compte les ruptures de chaîne du froid. Cet avis définit également des protocoles de test de croissance de *Listeria monocytogenes* dans les denrées.

### **3. Contrôles réalisés**

#### **3.1. Auto-contrôles des industriels**

Afin de maîtriser le risque microbiologique, et donc le risque *Listeria*, les industriels des différentes filières agro-alimentaires dont la filière porcine réalisent des auto-contrôles sur leurs produits à différents stades du process ainsi que dans l'environnement de production. En ce qui concerne l'abattage et la découpe de porc les arrêtés ministériels du 17 mars 1992 modifiés indiquent que c'est l'exploitant qui définit la nature, la fréquence des contrôles, les méthodes d'échantillonnage et d'analyse avec l'approbation par le Directeur des Services Vétérinaires. Ces auto-contrôles permettent aux industriels de s'assurer de l'efficacité des mesures préventives adoptées afin de maîtriser ce risque *Listeria monocytogenes* et également de s'assurer du respect de la réglementation.

Les industriels doivent également réaliser des tests de vieillissement visant à déterminer pour leurs différents produits la Date Limite de Consommation (DLC). La DLC est une date impérative mentionnée sur le conditionnement des denrées périssables. Elle indique clairement le moment jusqu'auquel ce produit conserve ses propriétés spécifiques dans les conditions appropriées. Au-delà de cette date, les produits sont considérés comme impropres à la consommation, doivent être retirés de la vente et ne doivent pas être consommés. Ces tests prennent en compte tout particulièrement *Listeria monocytogenes* bactérie capable de continuer de se développer au froid.

#### **3.2. Contrôles à la distribution de la DGCCRF**

Afin d'évaluer et de suivre la contamination, par *Listeria monocytogenes*, des aliments réputés sensibles dans les circuits de distribution, la direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes a mis en place un plan de surveillance depuis 1993 (cf. Chapitre II 2-4-1-2).

## **Partie II : PRESENTATION DES RESULTATS**

## 1. Protocole technique

### 1.1. Sites industriels : nombre et caractéristiques

Notre étude a été réalisée, de 1998 à 2001, dans huit entreprises françaises d'abattage-découpe de porc volontaires.

Plusieurs éléments techniques diffèrent entre ces huit entreprises :

- la vitesse de la chaîne d'abattage allant de 160 à 720 porcs/heure,
- le volume d'abattage journalier allant de 1200 à 7500 porcs/jour,
- le volume de découpe journalier allant de 650 à 4000 porcs/jour,
- le type de froid lors de la première phase de ressuage dynamique des carcasses :
  - Froid sec négatif : température négative pendant 1h30 à 2h00 (de -20°C à -10°C selon les entreprises pendant 30mn environ puis autour de -4°C/0°C).
  - Froid brumisé positif : température ambiante positive d'environ +3°/+4°C avec brumisation intermittente de gouttelettes d'eau sur la carcasse.

Par type de froid quatre entreprises ont été étudiées : ateliers 1, 3, 7, 8 en froid négatif, et ateliers 2, 4, 5, 6 en froid brumisé positif.

De par leur nombre et les caractéristiques de leur production, ces entreprises constituent un échantillon représentatif de l'abattage-découpe de porc français.

### 1.2. Locaux prélevés

Les prélèvements ont été réalisés dans l'environnement de production après les opérations de nettoyage-désinfection. La présente étude s'est intéressée uniquement au premier frigo de ressuage ainsi qu'aux salles de découpe. Selon une étude précédente (Corrégé, 1997) ces locaux s'avèrent particulièrement contaminés en *Listeria monocytogenes*, même après nettoyage-désinfection. Lors des opérations qui s'y déroulent (premier ressuage et découpe) le niveau de contamination des produits augmente considérablement.

### 1.3. Prélèvements et analyses réalisés

Pour chaque site environnemental défini, trois types d'analyses ont été effectués : dénombrement et recherche de *Listeria monocytogenes* et des autres espèces de *Listeria*, dénombrement semi-quantitatif de la flore mésophile totale et mesure de l'ATP.

L'objectif de ces différentes analyses est d'étudier s'il existe une éventuelle relation entre la présence et le nombre de *Listeria monocytogenes* et le nombre et la présence d'autres *Listeria* ou de la flore mésophile totale ou d'ATP résiduelle. Si c'est le cas, les analyses *Listeria monocytogenes* pourraient être remplacées par une de ces autres analyses moins coûteuses.

### 1.3.1. Dénombrement et recherche de *Listeria monocytogenes* et des autres espèces de *Listeria*

#### 1.3.1.1. Prélèvement

Pour chaque site, deux chiffonnettes stériles (32\*40cm) ont été utilisées, l'une imbibée de 25 ml de demi-Fraser, l'autre de 25 ml d'eau peptonnée tamponnée (EPT) avec 10% de neutralisant.

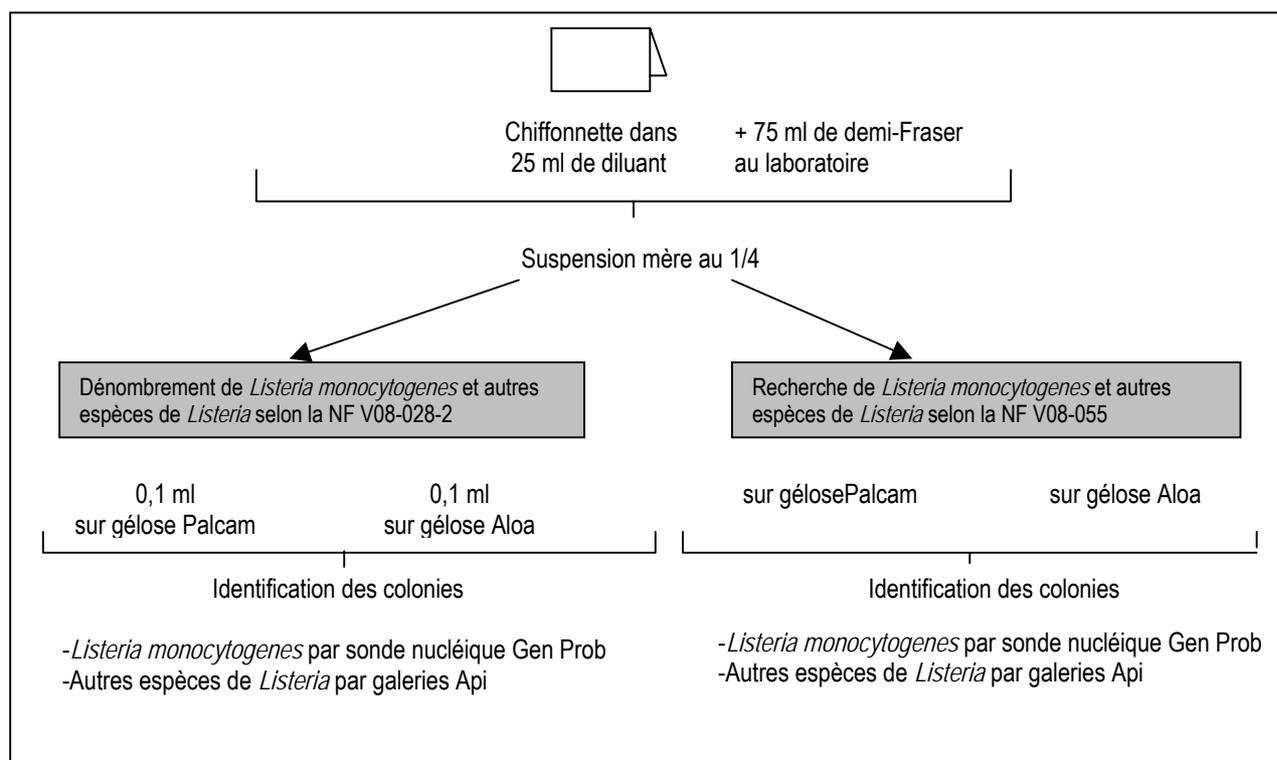
Avec chaque chiffonnette une surface d'environ 1 m<sup>2</sup> a été prélevée, en réalisant une succession de mouvements verticaux, horizontaux puis en diagonale, soit pour chaque site une surface prélevée de 2m<sup>2</sup> environ.

Les chiffonnettes ont été transportées au laboratoire sous le régime du froid positif (2°C +/-2°C) dans une glacière remplie de bloc réfrigérants.

#### 1.3.1.2. Analyses réalisées

Un dénombrement et une recherche de *Listeria monocytogenes* et des autres espèces de *Listeria* ont été effectués sur chaque chiffonnette selon le diagramme suivant (figure 3):

Figure 3: Diagramme des analyses *Listeria* réalisées sur les chiffonnettes



Pour chaque site de prélèvement le résultat correspond à la fusion des résultats de chaque chiffonnette (avec demi-Fraser et Eau Peptonnée Tamponnée + neutralisant).

Dans l'étude nous avons utilisé les deux types de diluant dans l'optique de faire une comparaison mais aucune différence significative n'a été mise en évidence (comparaison en séries appariées).

Pour les contrôles *Listeria* dans l'environnement après nettoyage-désinfection il est préconisé d'imbibber la chiffonnette avec 25ml (à adapter selon la taille de chiffonnette) d'EPT ou un autre diluant comme le Tryptone sel avec 10% de neutralisant et, au laboratoire, rajouter du diluant au 1/10<sup>ème</sup>, EPT ou demi-Fraser selon l'analyse (AFSSA, données non publiées).

### 1.3.2. Dénombrement semi-quantitatif de la Flore Mésophile Totale à 30°C

#### 1.3.2.1. Prélèvement

Pour chaque site de prélèvement, une boîte contact de 20 cm<sup>2</sup> (Hygicount 4N, AES Laboratoire) a été utilisée pour le dénombrement semi-quantitatif de la Flore Mésophile Totale. Cette méthode permet notamment d'estimer la qualité du nettoyage-désinfection.

Chaque boîte a été appliquée avant chiffonnage, au milieu de la zone de chiffonnage, avec pression, durant 15 secondes.

#### 1.3.2.2. Analyse et interprétation

Au laboratoire les boîtes contact ont été incubées pendant 48h à 30°C puis l'ensemble des colonies bactériennes, levures et moisissures a été compté pour chacune des boîtes donnant ainsi un résultat en nombre d'UFC/boîte.

L'interprétation est réalisée selon les préconisations du Guide de Bonnes Pratiques Hygiéniques en Abattage et Découpe de Porc (Certiviande, 1995).

Chaque boîte est notée au vu de son dénombrement selon une grille à quatre notes:

- Note 1 : <10 colonies / boîte: bon
- Note 2 : 10 à 49 colonies / boîte : moyen
- Note 3 : 50 à 150 colonies / boîte : mauvais
- Note 4 : > 150 colonies / boîte: très mauvais

Par atelier une note globale peut être calculée, elle correspond à la somme des notes individuelles de chaque site divisée par le nombre total de sites contrôlés dans l'atelier.

Cette note globale permet d'avoir une idée globale du niveau de contamination des surfaces avant la reprise d'activité et donc de la qualité du nettoyage-désinfection dans l'atelier.

Le nettoyage-désinfection est alors considéré comme :

- très satisfaisant si la note globale de l'atelier est égale à 1
- satisfaisant si la note globale de l'atelier est < 2
- insuffisant si la note globale de l'atelier est  $\geq 2$

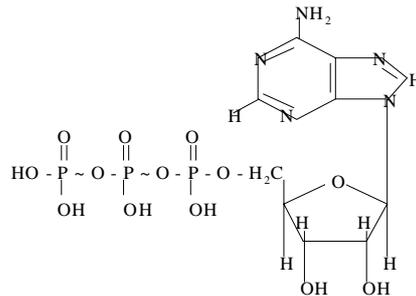
### 1.3.3. Mesure de l'ATP

(Minvielle, 2000)

#### 1.3.3.1. Rappel sur le principe

L'ATP ou adénosine-triphosphate est la molécule énergétique de base présente dans toutes les cellules vivantes.

Figure 4 : Molécule d'ATP



L'hydrolyse des liaisons pyrophosphates (représentées par un ~ sur la figure 4) libère une importante quantité d'énergie utilisable par les cellules dans des réactions anaboliques (biosynthèse de macromolécules), cataboliques, mais aussi dans certaines réactions de transport, de transmission, de fonctionnement du système nerveux ou des travaux mécaniques (contraction musculaire). L'ATP est produite par les systèmes producteurs d'énergie tels que la respiration, la fermentation ou la photosynthèse (Weil, 1990). L'ATP est donc un indicateur de la présence de cellules vivantes.

On distingue trois sources d'ATP :

- ATP d'origine microbienne, provenant des bactéries, des levures ou des moisissures ;
- ATP dite "somatique", provenant de cellules d'êtres vivants (lait, sang, muscle, végétaux,...) ;
- ATP extra-cellulaire, provenant de débris de micro-organismes ou de cellules somatiques. Cette ATP est rapidement dégradée dans le milieu extérieur.

Les quantités d'ATP sont très variables d'un type de cellule à l'autre. Ainsi lorsque les concentrations relatives sont comparées, les ordres de grandeur sont les suivants :

- Bactérie : 1
- Levure : 100
- Cellule somatique : 300 000

La concentration en ATP d'une cellule dépend de l'état physiologique de celle-ci, mais les ordres de grandeur entre type de cellules restent les mêmes (*Escherichia coli* :  $10^{-15}$ g/cellule; *Saccharomyces cerevisiae*:  $150 \cdot 10^{-15}$ g /cellule) (Champiat et Larpent, 1993).

Si on détecte de l'ATP sur une surface ou dans un liquide, c'est qu'il y a présence de cellules vivantes. Dans le cas d'ATP microbien, la présence de micro-organismes représente un risque direct puisqu'il peut y avoir contamination des aliments. En revanche, si l'ATP est d'origine somatique, c'est qu'il reste des débris organiques sur la surface, ceux-ci pouvant servir de support de croissance pour des micro-organismes, c'est alors un risque indirect pour les aliments qui est détecté.

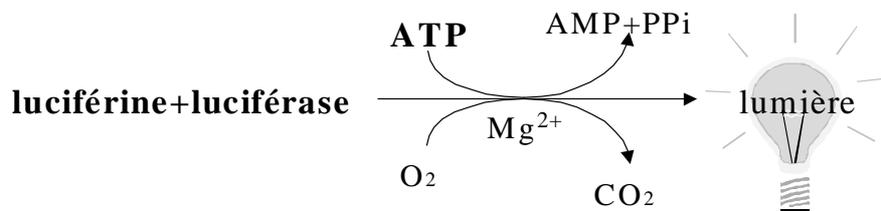
Les appareils disponibles pour l'industrie agro-alimentaire ne permettent pas de différencier ATP microbien et ATP somatique, mais il existe des appareils de laboratoire beaucoup plus précis qui permettent de faire cette distinction. Cependant, dans la mesure où il y a 300 000 fois plus d'ATP dans une cellule somatique que dans une bactérie, la détection d'ATP dans l'industrie agro-alimentaire revient à détecter la présence de débris organiques.

Dans le cadre du contrôle du nettoyage-désinfection, la présence d'ATP est un indicateur de propreté organique, donc d'hygiène et de risque.

L'ATP-métrie permet de doser les quantités d'ATP présentes sur les surfaces ou les eaux de rinçage. Le dosage de l'ATP est basé sur une réaction enzymatique qui existe naturellement chez un certain nombre d'être vivants (luciole, méduses,...), la bioluminescence.

L'ATP-métrie utilise le complexe enzymatique luciférine-luciférase (isolé chez la luciole) pour doser l'ATP. Ce complexe enzymatique, en présence d'oxygène et de magnésium, transforme l'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP en lumière, la quantité de lumière émise étant proportionnelle à la quantité d'ATP (figure 5).

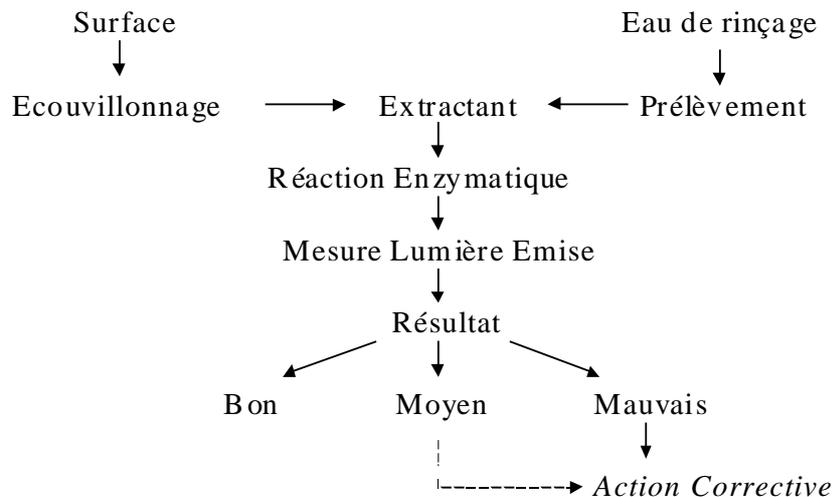
Figure 5 : Principe de l'ATP-métrie



Il suffit donc de mesurer la quantité de lumière émise (en unité relative de lumière ou URL) pour déterminer la quantité d'ATP initialement présente.

Pour la validation du nettoyage, plus la surface ou l'eau de rinçage contiendra de résidus organiques, plus la valeur fournie en URL sera élevée. Inversement, une valeur très faible en URL signifiera que la surface ou l'eau de rinçage contient très peu d'ATP, et donc qu'elle est "propre" (figure 6).

Figure 6 : L'ATP-métrie pour valider le nettoyage



### 1.3.3.2. Prélèvements et Analyses

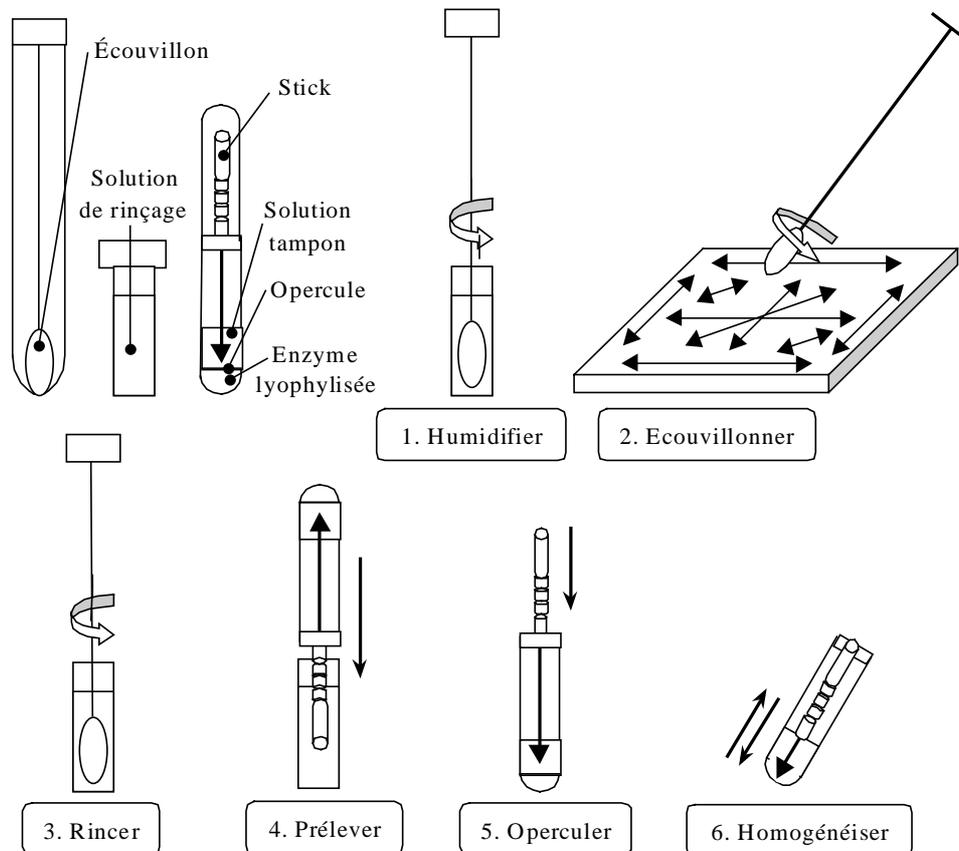
Pour chaque site de prélèvement, une surface de 25 cm<sup>2</sup> est écouvillonnée, suivant un gabarit, à l'aide d'un écouvillon exempt d'ATP, en effectuant des allers-retours en hauteur, largeur et diagonale, tout en faisant tourner l'écouvillon sur lui-même.

L'ATP-mètre utilisé lors de l'étude est le Hy-Lite, commercialisé par la société MERCK S.A..

Le système Hy-Lite est composé de trois éléments : l'écouvillon, la solution de rinçage et le stylo de mesure. Le stylo de mesure est composé d'un stick de prélèvement contenant de l'extractant, d'un compartiment de réaction renfermant la solution tampon et le complexe enzymatique lyophilisé, séparé de la solution tampon par un opercule métallique. Après avoir humidifié l'écouvillon avec la solution de rinçage (étape 1, figure 7), la surface est écouvillonnée (étape 2), ce qui a été ainsi prélevé est alors remis en suspension dans la solution de rinçage (étape 3). Le stick du stylo de mesure est plongé dans la solution de rinçage et prélève une quantité fixe de liquide (étape 4), le stick est alors enfoncé dans le compartiment de réaction du stylo contenant la solution tampon (étape 5). Après avoir operculé le compartiment contenant l'enzyme lyophilisée, le stylo est agité afin d'homogénéiser la solution enzymatique ainsi formée (étape 6) et introduit dans la chambre de lecture de l'appareil pour réaliser la mesure.

Les résultats des mesures d'ATP sont exprimés en unité relative de lumière (URL), sachant qu'il n'existe pas d'unité internationale standard.

Figure 7 : Mode opératoire de l'ATP-mètre Hy-Lite.



## 1.4. Sites de prélèvements

### 1.4.1. Nature des sites

Les sites de prélèvements sont répartis en deux catégories, les sites accessibles et les sites inaccessibles. Deux aspects du danger que représente la contamination des locaux par *Listeria monocytogenes* sont ainsi pris en compte.

Les sites qualifiés "d'accessibles" sont des zones directement accessibles lors du nettoyage-désinfection classique quotidien et sont donc normalement nettoyées et désinfectées tous les jours en fin d'activité (ex : tables, tapis, et autres structures à moins de 2 mètres de hauteur, etc...). Ces sites sont, pour la plupart, en contact direct avec les produits alimentaires et représentent donc un risque majeur de contamination croisée. Une contamination élevée de ces sites révèle une insuffisance ou des dérives des opérations de nettoyage-désinfection classiques. Remédier à ce problème semble relativement simple si tant est que le diagnostic en a été fait. Etant donné le risque majeur de contamination des produits, via ces "sites accessibles", il est primordial que les entreprises en réalisent régulièrement la surveillance.

Les sites qualifiés « d'inaccessibles » ne sont pas directement accessibles lors du nettoyage-désinfection quotidien (ex: murs à plus de 2 mètres de hauteur, plafonds, ventilateurs, rails, etc..). En pratique, ces zones sont nettoyées-désinfectées selon

des fréquences variables allant de 1 fois/mois à 1 fois/an. Une contamination élevée de ces sites révèle une contamination résiduelle qui s'accumule au cours du temps dans l'atelier. Ces sites n'interviennent pas directement dans la contamination des produits mais peuvent être à l'origine d'un "bruit de fond" persistant de contamination en *Listeria monocytogenes* qui peut s'étendre progressivement au reste de l'atelier et notamment à des zones en contact avec les produits carnés.

Dans l'étude, les sites de prélèvements ont donc été choisis en fonction du type d'installation parmi les sites suivant :

- Frigo de ressuage :
  - Sites accessibles (à moins de 2 mètres de haut): porte, mur, cabine de brumisation, poteau, sol, etc...
  - Sites inaccessibles (à plus de 2 mètres de haut): porte, mur, cabine de douchage, poteau, plafond, ventilateur, rail, etc...
- Salle de découpe :
  - Sites accessibles (à moins de 2 mètres de haut): tables de travail, support tables, dessus et dessous des tapis intralox, dessus et dessous de tapis bande, bacs, scies, sol, portes frigo, balancelles, poteau, etc...
  - Sites inaccessibles (à plus de 2 mètres de haut): portes de frigo, mur, plafond, ventilateur, chaussettes de ventilation, rail etc...

D'une répétition à l'autre, dans une entreprise donnée, ce sont les mêmes sites qui ont été prélevés.

#### 1.4.2. Nombre de sites prélevés

A chaque répétition, en frigo de ressuage 15 sites ont été prélevés et en salle de découpe 30 sites, répartis en trois cinquième d'inaccessibles (9 en frigo et 18 en découpe) et deux cinquième d'accessibles (6 en frigo et 12 en découpe).

En boîtes contact et ATP-métrie, tous les sites ont été analysés après prélèvement. Pour les analyses *Listeria*, seulement un tiers des chiffonnettes est analysé en frais. Les deux autres tiers ont été congelés à  $-20^{\circ}\text{C}$  au laboratoire et analysés en fonction des résultats du premier tiers (figure 8).

*Listeria* n'est pas particulièrement sensible à la congélation. Gary (2002) montre que sur du jambon cuitensemencé en *Listeria monocytogenes* et congelé à  $-20^{\circ}\text{C}$  pendant 21 jours aucun stress n'affecte les *Listeria* et la mortalité est très faible. Dans le cadre de notre étude, certes la matrice est différente, mais la congélation ne doit pas avoir fortement affecté le résultat des analyses *Listeria*.

En ressuage les sites numérotés de 1 à 9 sont inaccessibles et ceux de 10 à 15 accessibles. En découpe, les sites de numérotés de 16 à 33 sont inaccessibles et ceux de 34 à 45 accessibles.

#### 1.5. **Nombre de répétitions**

Le nombre de répétitions réalisé a varié selon la contamination environnementale détectée.

Sont qualifiées de « faiblement contaminées » les entreprises où, à chaque répétition, moins de 20% des chiffonnettes analysées sont contaminées en *Listeria monocytogenes*. Dans ces entreprises trois répétitions sont réalisées. La deuxième répétition est effectuée trois mois après la première et la troisième trois à six mois après la deuxième (figure 7).

Les entreprises « fortement contaminées » sont celles où, lors d'une répétition 30% ou plus des chiffonnettes analysées sont positives en *Listeria monocytogenes*. Dans ces entreprises cinq répétitions sont prévues : une initiale puis une deuxième juste après le nettoyage désinfection approfondi puis une troisième un mois après et les autres 1 à 3 mois après selon les prévalences (figure 8).

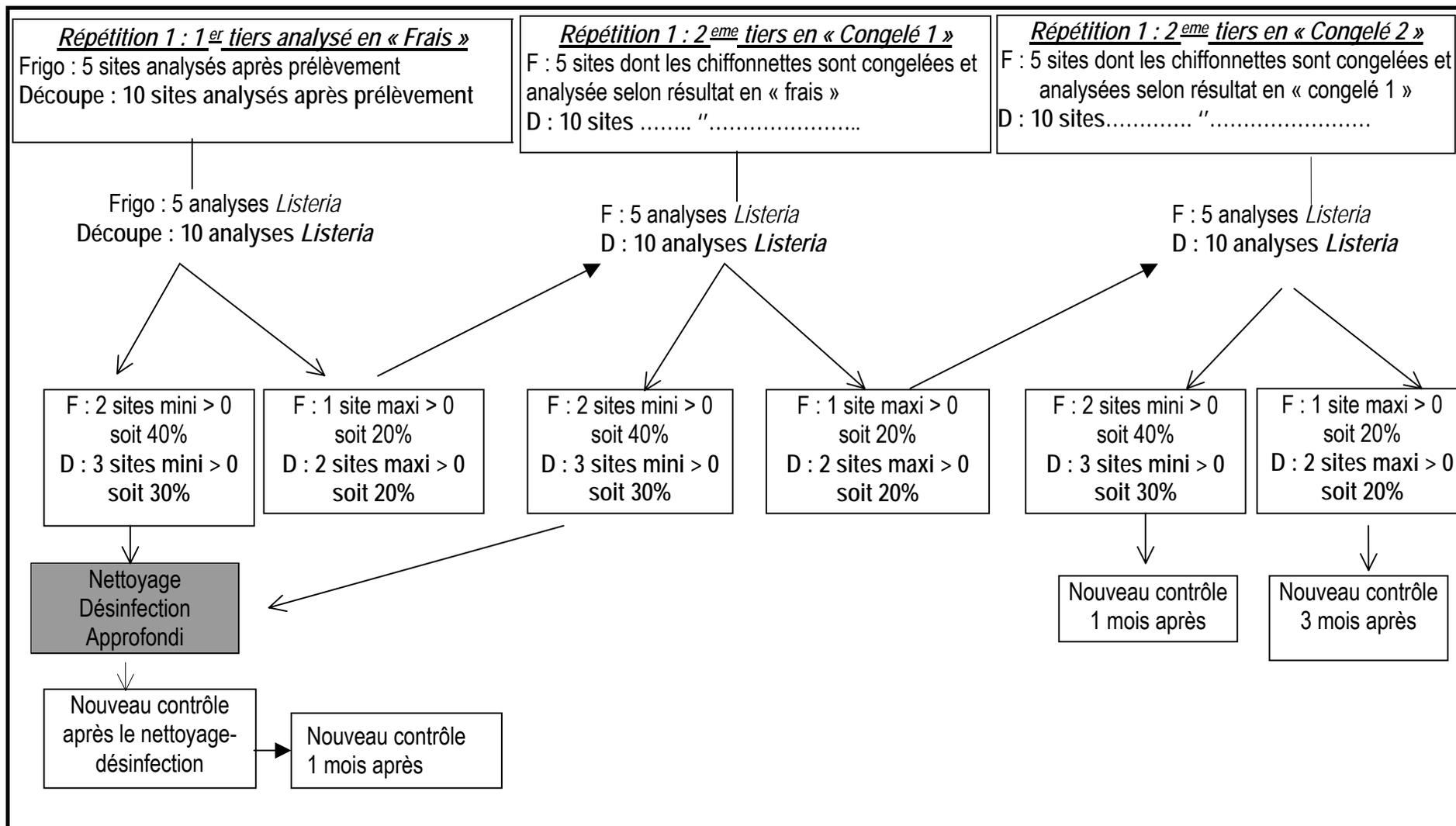
### **1.6. Le nettoyage-désinfection approfondi**

Un nettoyage-désinfection approfondi est prévu si, lors d'une répétition, 30% ou plus des chiffonnettes sont positives en *Listeria monocytogenes* (figure 8). Ce nettoyage désinfection approfondi, prévu dans les entreprises « fortement contaminées », consiste tout simplement en :

- Un contrôle des procédures de nettoyage-désinfection prévues,
- Un contrôle de l'application de ces procédures,
- Une attention particulière dans la réalisation du nettoyage-désinfection sur les sites trouvés contaminés ainsi que sur les sites de même nature.

Dans un premier temps il n'a pas été prévu de changer les produits ni les procédures de nettoyage-désinfection. Toutefois si des sites trouvés contaminés n'étaient pas habituellement nettoyés-désinfectés tous les jours (ex : dessous de tapis), alors ils ont été spécialement nettoyés-désinfectés lors du nettoyage-désinfection approfondi.

Figure 8: Plan d'échantillonnage des prélèvements en chiffonnettes et des analyses, à chaque répétition, et chronologie des répétitions



« > 0 » signifie positif en *Listeria monocytogenes* en dénombrement et/ou recherche. F : Frigo de ressuage D : découpe

## 2. Résultats

### 2.1. Résultats généraux *Listeria monocytogenes* et autres espèces

Sur l'ensemble de l'étude 12% (149/1199) des sites sont positifs en *Listeria* après le nettoyage-désinfection, respectivement 7% des sites sont contaminés en *Listeria monocytogenes* et 6% en d'autres *Listeria* (tableau 17).

En découpe, après nettoyage-désinfection, 16% (132/824) des sites sont contaminés en *Listeria*, respectivement 8% (66/824) en *Listeria monocytogenes* et 8% (66/824) en *Listeria* autres.

En ressuage, après nettoyage-désinfection, 5% (17/375) des sites sont contaminés en *Listeria*, respectivement 4% (14/375) en *Listeria monocytogenes* et 1% (3/375) en *Listeria* autres.

Plus d'un tiers (29/80) des sites contaminés en *Listeria monocytogenes* est également contaminé en d'autres espèces de *Listeria* : *welshimeri* essentiellement mais aussi pour environ 20% en *Listeria innocua*. En découpe et ressuage respectivement 39% et 21% des sites contaminés en *Listeria monocytogenes* sont également contaminés par d'autres *Listeria* spp.

Les prévalences détectées dans notre étude sont surestimées dans le sens où, d'une répétition sur l'autre, les sites déjà trouvés contaminés en *Listeria monocytogenes* et en autres *Listeria* ont été analysés préférentiellement afin d'évaluer leur persistance dans le temps.

Toutefois, elles révèlent une nette amélioration de la situation par rapport à une étude antérieure (Corrégé, 1997) qui montre un taux de contamination par *Listeria monocytogenes* après nettoyage-désinfection de 24% en salles de découpe et de 30% dans les frigo de ressuage.

Tableau 17: Pourcentages de sites contaminés en *Listeria monocytogenes* et en autres espèces de *Listeria* en découpe et ressuage

Lieu	% de sites positifs en <i>Listeria</i> spp.	% de sites positifs en <i>L. monocytogenes</i>	dont % de sites également positifs en <i>L. spp</i> autres	% de sites positifs en <i>Listeria</i> spp. autres
Découpe	16% (132/824)	8% (66/824)	39% (26/66)	8% (66/824)
Ressuage	5% (17/375)	4% (14/375)	21% (3/14)	1% (3/375)
Total	12% (149/1199)	7% (80/1199)	36% (29/80)	6% (69/1199)

## 2.2. Détails des résultats *Listeria monocytogenes* par atelier

### 2.2.1. En salle de découpe

#### 2.2.1.1. Ensemble des ateliers

Le tableau 18 récapitule les prélèvements positifs en *Listeria monocytogenes* dans les salles de découpe des huit entreprises de l'étude ainsi que le nombre de répétitions et les nettoyage-désinfection approfondis réalisés.

Toutes les analyses *Listeria* de l'étude ne sont pas incluses dans ce tableau car lorsqu'un nettoyage-désinfection approfondi est déclenché, les séries de chiffonnettes congelées ne sont pas prises en compte conformément à la figure 8.

Tableau 18 : Prélèvements positifs en *Listeria monocytogenes* dans les salles de découpe après-nettoyage-désinfection

Ateliers	Nombre de répétitions	Nombre de Nettoyage Désinfection Approfondi	Nombre de prélèvements	Prélèvements positifs en <i>Listeria monocytogenes</i>	
				% de positifs* (nb)	% de positifs détectés au dénombrement (nb)
<b>SANS NETTOYAGE DESINFECTIION APPROFONDI</b>					
2	3	0	90	1% (1)	100% (1)
3	3	0	90	3% (3)	33% (1)
5	3	0	90	3% (3)	67% (2)
6	3	0	90	1% (1)	100% (1)
7	3	0	90	1% (1)	0% (0)
Sous-Total	15	0	450	2% (9)	56% (5)
<b>AVEC NETTOYAGE DESINFECTIION APPROFONDI</b>					
1	5	2	90	14% (13)	8% (1)
4	5	1	129	8% (10)	40% (4)
8	6	2	86	30% (26)	62% (16)
Sous-Total	16	5	305	16% (49)	43% (21)
<b>Total</b>	<b>31</b>	<b>5</b>	<b>755</b>	<b>8% (58)</b>	<b>45% (26)</b>

\* en dénombrement et/ou recherche

Sur 755 prélèvements réalisés en salle de découpe après nettoyage-désinfection, 8% (58/755) sont positifs en *Listeria monocytogenes*. Des différences de contamination existent entre les huit ateliers (test du  $\chi^2$ ,  $p < 0,0001$ ) (tableau 18).

Près de la moitié des prélèvements positifs (26/58) le sont au dénombrement avec des résultats allant de 40 à plus de 5000 colonies / ml de diluant ce qui correspond au maximum à 12,5 colonies/cm<sup>2</sup>. Donc lorsque des *Listeria monocytogenes* sont présentes dans l'environnement des salles de découpe elles sont en assez grand nombre. Ce résultat va d'ailleurs à l'encontre de ceux de Corrége (1997).

### 2.2.1.2. Ateliers faiblement contaminés

Cinq ateliers, n<sup>os</sup> 2, 3, 5, 6, 7, peuvent être qualifiés de « faiblement contaminés » en *Listeria monocytogenes*. Dans ces ateliers en moyenne 2% (9/450) des sites environnementaux sont contaminés en *Listeria monocytogenes*. Selon les ateliers, cette prévalence moyenne varie de 1% (1/90) à 3% (3/90) (tableau 18).

Ces cinq ateliers n'ont pas eu à réaliser de nettoyage-désinfection approfondi. A chaque répétition, ces ateliers avaient, au plus, 7% (2/30) des sites contaminés en *Listeria monocytogenes* (tableau 19).

Sur une période de 6 mois aucune dérive n'est donc apparue dans la contamination environnementale par *Listeria monocytogenes* des salles de découpe de ces ateliers.

Tableau 19 : Prélèvements positifs en *Listeria monocytogenes*, par répétition, dans les salles de découpe après-nettoyage-désinfection, dans les ateliers « faiblement contaminés »

Atelier	Répétition	Moment	Nombre de prélèvements analysés	% de positifs* en <i>Listeria monocytogenes</i> (nb)
2	1	J1	30	0% (0)
	2	J2= J1 + 3 mois	30	3% (1)
	3	J3= J1 + 6 mois	30	0% (0)
3	1	J1	30	0% (0)
	2	J2= J1 + 3 mois	30	7% (2)
	3	J3= J1 + 6 mois	30	3% (1)
5	1	J1	30	7% (2)
	2	J2= J1 + 3 mois	30	3% (1)
	3	J3= J1 + 6 mois	30	0% (0)
6	1	J1	30	0% (0)
	2	J2= J1 + 3 mois	30	3% (1)
	3	J3= J1 + 6 mois	30	0% (0)
7	1	J1	30	3% (1)
	2	J2= J1 + 3 mois	30	0% (0)
	3	J3= J1 + 6 mois	30	0% (0)

\* en dénombrement et/ou recherche

### 2.2.1.3. Ateliers fortement contaminés

Trois ateliers n<sup>os</sup> 1, 4, 8, peuvent être qualifiés de « fortement contaminés ». Dans ces ateliers en moyenne 16% (49/305) des sites environnementaux des salles de découpe ont été détectés positifs en *Listeria monocytogenes*. Selon les ateliers cette prévalence moyenne varie de 8% (10/129) à 30% (26/86) (tableau 18).

Le détail des résultats obtenus à chacune des répétitions est consigné dans le tableau 20. Ces trois ateliers « fortement contaminés » ont eu une série de prélèvements avec au moins 30% (3/10) des prélèvements positifs en *Listeria monocytogenes* déclanchant ainsi un nettoyage-désinfection approfondi. Lors de cette série, les analyses *Listeria* ont été arrêtées dès le premier tiers de chiffonnettes, en frais.

Tableau 20 : Prélèvements positifs en *Listeria monocytogenes*, par répétition, dans les salles de découpe après-nettoyage-désinfection, dans les ateliers « fortement contaminés »

Atelier	Répétition	Moment	Nombre de prélèvements	% de positifs* en <i>Listeria monocytogenes</i> (nb)
1	1	J1	30	0% (0)
	2	J2= J1 + 3 mois	30	7% (2)
	3	J3= J1 + 6 mois	10	<b>30%</b> (3)
	4	J4= après 1 <sup>er</sup> nettoyage-désinfection approfondi	10	<b>50%</b> (5)
	5	J5= après 2 <sup>ème</sup> nettoyage-désinfection approfondi	10	<b>30%</b> (3)
4	1	J1	30	10% (3)
	2	J2= J1 + 3 mois	10	<b>40%</b> (4)
	3	J3= après 1 <sup>er</sup> nettoyage-désinfection approfondi	30	0% (0)
	4	J4= J3 + 1 mois	29	0% (0)
	5	J5= J3 + 4 mois	30	10% (3)
8	1	J1	30	13% (4)
	2	J2= J1 + 3 mois	10	<b>30%</b> (3)
	3	J3= après 1 <sup>er</sup> nettoyage-désinfection approfondi	10	<b>70%</b> (7)
	4	J4= après 2 <sup>ème</sup> nettoyage-désinfection approfondi	11	<b>27%</b> (3)
	5	J5= J4 + 1 mois	14	<b>29%</b> (4)
	6	J6= J4 + 4 mois	11	<b>45%</b> (5)

■ : Prélèvements réalisés juste après le nettoyage-désinfection approfondi

Dans aucun des ateliers le seuil des 30% d'échantillons positifs en *L. monocytogenes* n'a été atteint dès la première répétition. Un premier contrôle avec 30 analyses a été nécessaire pour faire un bon état des lieux de la contamination environnementale et ainsi détecter les sites contaminés. Lors des répétition suivantes, les sites déjà trouvés positifs ont alors été analysés préférentiellement en frais et ainsi, du fait d'une persistance de la contamination dans le temps (cf. 2-4), le seuil des 30% minimum de positifs a été atteint.

Lors d'un premier « contrôle *Listeria* » dans l'environnement, il apparaît donc indispensable de prélever un nombre important de sites afin de détecter ceux à risque.

#### 2.2.1.4. Efficacité du nettoyage-désinfection approfondi

Dans les ateliers fortement contaminés, après la série de prélèvement révélant au moins 30% (3/10) des échantillons positifs en *Listeria monocytogenes*, les entreprises ont réalisé un nettoyage-désinfection approfondi.

Ce nettoyage-désinfection approfondi consistait à :

- Vérifier les procédures de nettoyage-désinfection existantes,
- Convenir avec les opérateurs du bon respect des procédures et s'assurer sur le terrain de ce respect,
- Inclure dans ce nettoyage-désinfection les sites non concernés par les opérations classiques.

En pratique tous les ateliers appliquent des procédures « classiques » de nettoyage-désinfection, à savoir : un pré-lavage à l'eau chaude surpressée, un détergent alcalin-chloré en application mousse, un rinçage environ 20 minutes après et un désinfectant type ammonium quaternaire, associé ou non à une glutaraldéhyde, sous forme mousse ou en pulvérisation.

Les sites non nettoyés-désinfectés habituellement et inclus pour l'occasion dans les opérations approfondies sont essentiellement :

- les structures en hauteurs, qui sont, au mieux, nettoyées-désinfectées 1 fois/trimestre,
- les intérieurs (dessous) de tapis qui sont soit non faits, soit mal faits c'est à dire sans être détendus ni relevés afin d'appliquer correctement les produits.

Une série de contrôles a été réalisée juste après ce nettoyage-désinfection approfondi.

Il est surprenant de constater que ce nettoyage-désinfection approfondi n'a été apparemment efficace contre *Listeria monocytogenes* que dans un atelier sur trois, l'atelier n°4 (tableau 20). En effet dans les deux autres ateliers, le pourcentage de sites positifs en *Listeria monocytogenes* reste élevé, même après le nettoyage-désinfection approfondi

Les différences de procédures et d'application des procédures entre ces trois ateliers n'ont pas été étudiées en détail : pas de chronométrage, pas de prise de température etc... Toutefois deux points peuvent expliquer au moins partiellement cette différence d'efficacité:

- dans l'atelier 4, après les résultats défavorables de la deuxième répétition, des procédures supplémentaires de nettoyage-désinfection ont été mises en place et maintenues :
  - les tapis sont détendus et levés quotidiennement afin de nettoyer et désinfecter correctement l'intérieur,
  - les poutrelles sont nettoyées avec un détergent enzymatique 1 fois/semaine,

- les plafonds sont nettoyés-désinfectés avec un détergent-désinfectant mousse 1 fois tous les 15 jours.

Lorsque la série de prélèvements de contrôle a été effectuée, ces procédures supplémentaires de nettoyage-désinfection étaient déjà en place depuis plusieurs semaines. Elles ont été réalisées sans main d'œuvre supplémentaire, simplement grâce à une meilleure organisation. Ces procédures supplémentaires ont même été définitivement maintenues car l'équipe de nettoyage, motivée, n'a pas voulu revenir en arrière.

– dans les ateliers 1 et 8 :

- le jour du nettoyage-désinfection approfondi, des problèmes de personnel manquant ont été constatés pour l'un des ateliers, travaillant en prestation de service,
- l'équipe de nettoyage paraissait moins sensibilisée, moins motivée.

L'information et la sensibilisation de l'équipe de nettoyage-désinfection joue un rôle primordial dans son implication et donc dans la qualité et l'efficacité des opérations de nettoyage-désinfection, qu'elles soient approfondies ou non.

## 2.2.2. En frigo de ressuage

### 2.2.2.1. Ensemble des ateliers

Le tableau 21 récapitule les prélèvements positifs en *Listeria monocytogenes* dans les frigos de ressuage des huit entreprises de l'étude ainsi que le nombre de répétitions et les nettoyages-désinfections approfondis réalisés.

Les prélèvements ont été réalisés après nettoyage-désinfection pour les ressuages en froid brumisé où ces opérations sont réalisées quotidiennement. En revanche, pour les ressuages en froid sec négatif, les opérations de nettoyage-désinfection n'ont lieu, au mieux, qu'une fois par semaine, du fait des contraintes thermiques qu'elles engendrent. Les prélèvements ont donc été réalisés en fin d'activité sans rapport forcément avec un nettoyage-désinfection.

Par contre, lorsqu'un nettoyage-désinfection approfondi a été réalisé, les prélèvements ont systématiquement été réalisés après celui-ci.

Au total sur 365 prélèvements réalisés, 4% (14/365) sont positifs en *Listeria monocytogenes* (tableau 21). Des différences de contamination existent entre les huit ateliers (test exact de Fisher,  $p < 0,0001$ ).

Lorsqu'elles sont présentes les *Listeria monocytogenes* le sont en faible nombre puisque seulement 2 échantillons sur 14 positifs le sont au dénombrement.

Tableau 21 : Prélèvements positifs en *Listeria monocytogenes* dans les frigos de ressuage

Ateliers	Nombre de répétitions	Nombre de Nettoyage Désinfection Approfondi	Nombre de prélèvements	Prélèvements positifs en <i>Listeria monocytogenes</i>	
				% de positifs*	% de positifs détectés au dénombrement (nb)
<b>SANS NETTOYAGE DESINFECTION APPROFONDI</b>					
1	3	0	45	4% (2)	0%
2	3	0	40	0% (0)	0%
3	3	0	45	0% (0)	0%
5	3	0	45	0% (0)	0%
6	3	0	45	0% (0)	0%
7	3	0	45	0% (0)	0%
Sous-Total	18	0	265	0,8% (2)	0% (0)
<b>AVEC NETTOYAGE DESINFECTION APPROFONDI</b>					
4	5	1	40	20% (8)	25% (2)
8	4	1	60	7% (4)	0% (0)
Sous-Total	9	2	100	10% (12)	20% (2)
<b>Total</b>	<b>27</b>		<b>365</b>	<b>4% (14)</b>	<b>14% (2)</b>

en dénombrement et/ou recherche

#### 2.2.2.2. Ateliers faiblement contaminés

Six ateliers , n<sup>o</sup>s 1, 2, 3, 5, 6, 7, peuvent être qualifiés de « faiblement contaminés ». Dans ces ateliers en moyenne 1% (2/265) des sites est contaminé en *Listeria monocytogenes*, avec dans cinq des six ateliers 0% des sites contaminés et dans seulement un atelier 4% (2/45) des sites contaminés en ressuage (tableau 21).

Ces ateliers n'ont pas eu à réaliser de nettoyage-désinfection approfondi. A chaque répétition, prise individuellement, ces six ateliers avaient au plus 7% (1/15) des sites positifs en *Listeria monocytogenes* (tableau 22).

Sur une période de six mois aucune dérive n'est donc apparue dans la contamination environnementale par *Listeria monocytogenes* des frigos de ressuage de ces ateliers.

Tableau 22 : Prélèvements positifs en *Listeria monocytogenes*, par répétition, dans les frigos de ressuage après-nettoyage-désinfection \*, dans les ateliers « faiblement » contaminés:

Atelier	Répétition	Moment	Nombre de prélèvements	% de positifs** en <i>Listeria monocytogenes</i> (nb)
1	1	J1	15	0% (0)
	2	J2= J1 + 3 mois	15	7% (1)
	3	J3= J1 + 6 mois	15	7% (1)
2, 3, 5, 6, 7	1	J1	10 ou 15	0% (0)
	2	J2= J1 + 3 mois	15	0% (0)
	3	J3= J1 + 6 mois	15	0% (0)

\*sauf ateliers 1, 3, 7.

\*\* en dénombrement et/ou recherche

### 2.2.2.3. Ateliers fortement contaminés

Deux ateliers, n<sup>os</sup> 4 et 8, peuvent être qualifiés de « fortement contaminés ». Dans ces ateliers en moyenne 10% (12/100) des sites environnementaux des frigos de ressuage ont été détectés positifs en *Listeria monocytogenes*. Selon les ateliers ces prévalences varient entre 7% (4/60) et 20% (8/40) (tableau 21).

Un des ateliers a eu une série de prélèvements déclanchant un nettoyage-désinfection approfondi, avec au moins 40% (2/5) des sites contaminés (tableau 23). Lors de cette série, les analyses *Listeria* ont été arrêtées dès le premier tiers de chiffonnettes, en frais. Pour l'atelier 8 lors de la première série de prélèvement les 15 sites ont été analysés ensemble, en frais, il n'y a donc que 20% (3/15) des sites contaminés (tableau 23).

Tableau 23 : Prélèvements positifs en *Listeria monocytogenes*, par répétition, dans les frigos de ressuage après-nettoyage-désinfection \*, dans les ateliers « fortement contaminés » :

Atelier	Répétition	Moment	Nombre de prélèvements	% de positifs** en <i>Listeria monocytogenes</i> (nb)
4	1	J1	15	13% (2)
	2	J2= J1 + 3 mois	15	7% (1)
	3	J3= J1 + 6mois	5	40% (2)
	4	J4= après 1 <sup>er</sup> nettoyage-désinfection approfondi	5	60% (3)
8	1	J1	15	20% (3)
	2	J2= après 1 <sup>er</sup> nettoyage-désinfection approfondi	15	0% (0)
	3	J3= J2 + 1 mois	15	0% (0)
	4	J4= J2 + 4 mois	15	7% (1)

\*sauf ateliers 8 répétition 1, 3 et 4.

\*\* en dénombrement et/ou recherche

#### 2.2.2.4. Efficacité du nettoyage-désinfection approfondi

Dans les ateliers « fortement contaminés », après la série de prélèvement révélant 40% (2/5) des échantillons positifs en *Listeria monocytogenes*, (20% pour l'atelier 8) les entreprises ont réalisé un nettoyage désinfection approfondi.

Ce nettoyage-désinfection approfondi consistait, comme en découpe, à :

- Vérifier les procédures existantes,
- Convenir avec les opérateurs du bon respect des procédures et s'assurer sur le terrain de ce respect,
- Inclure dans ce nettoyage-désinfection les sites non concernés par les opérations classiques.

En pratique tous les ateliers en froid brumisé positif appliquait quotidiennement des procédures « classiques » de nettoyage-désinfection à savoir : un prélavage à l'eau chaude surpressée, un détergent alcalin-chloré en application mousse, un rinçage environ 20 minutes après, un désinfectant type ammonium quaternaire associé ou non à une glutaraldéhyde sous forme mousse ou en pulvérisation.

Pour les ateliers en froid sec négatifs le nettoyage-désinfection a lieu 1 fois par semaine voire toutes les deux semaines avec un détergent ou un détergent-désinfectant. Certains ateliers n'ont même pas de procédure écrite pour le nettoyage-désinfection de ce local.

Les sites non nettoyés-désinfectés habituellement et inclus pour l'occasion dans les opérations approfondies sont essentiellement les structures en hauteurs, qui sont en général au mieux nettoyées-désinfectées 1 fois/trimestre voire une fois par an pour tout ce qui est rail et ventilation.

Certaines zones particulièrement encrassées, notamment les portes des sas de frigo, ont été nettoyées par brossage manuel avec détergent et éponge « grattoir » suivi de l'application du désinfectant.

Une série de prélèvements de contrôle a été réalisée juste après ce nettoyage-désinfection approfondi.

Ce nettoyage-désinfection approfondi n'a été efficace que dans l'atelier 8. Et le niveau de contamination est resté bas durant, au moins, les 4 mois qui suivirent.

#### 2.2.2.5. Résultats selon les types de réfrigération

Aucune différence significative de la contamination en *Listeria monocytogenes* n'a été mise en évidence entre les ressuges en froid brumisé positifs et les ressuges en froid sec négatif (tableau 24) (test du  $\chi^2$ ,  $p=0,42$ ).

Toutefois, il est important de noter que dans les ressuges très négatifs, (température ambiante inférieure à  $-10^{\circ}\text{C}$ ) le diluant des chiffonnettes gèle au contact des surfaces et reste en partie sur ces surfaces. Les prélèvements par chiffonnage ne sont peut être pas, dans ces conditions, très fiables.

Tableau 24 : Prélèvements positifs en *Listeria monocytogenes* selon les types de ressuage

Type de ressuage	Nombre de répétitions	Nombre de Nettoyage-Désinfection Approfondi	Nombre de prélèvements	Prélèvements positifs en <i>Listeria monocytogenes</i>	
				% de positifs*	% de positifs détectés au dénombrement (nb)
Froid brumisé positif	14	1	170	5% (8)	25% (2)
Froid sec négatif	13	1	195	3% (6)	0% (0)

\* en dénombrement et/ou recherche

## 2.3. Caractéristiques des sites contaminés en *Listeria*

### 2.3.1. Accessibilité

En considérant les salles de découpe et les frigos de ressuage, 12% (149/1199) des sites sont contaminés en *Listeria* (tableau 25).

Les sites accessibles sont significativement plus contaminés en *Listeria* que les sites inaccessibles (test du  $\chi^2$  ;  $p = 0,023$ ), respectivement 15 % (76/508) des sites accessibles contaminés contre 11% (73/691) des inaccessibles.

De même, en différenciant *Listeria monocytogenes* des autres espèces, les sites accessibles sont significativement plus contaminés que les inaccessibles, avec 9% (46/508) des accessibles contaminés en *Listeria monocytogenes* contre 5% (34/691) des inaccessibles (test du  $\chi^2$  ;  $p = 0,017$ ).

Toutefois, malgré ces différences significatives mises en évidence statistiquement, les niveaux de contamination entre sites accessibles et inaccessibles sont assez proches, et il est pratiquement plus raisonnable de considérer qu'ils représentent le même risque.

L'étude menée en 1995 par Corrégé (1997) ne met pas en évidence de différence significative de contamination en *Listeria monocytogenes* entre sites accessibles et sites inaccessibles en découpe après nettoyage-désinfection.

Tableau 25 : Contamination en *Listeria* des sites de découpe et de ressuage selon leur accessibilité

	Sites accessibles	Sites inaccessibles	Total des sites
% de positifs en <i>Listeria monocytogenes</i>	9% (46/508)	5% (34/691)	7% (80/1199)
% de positifs en autres <i>Listeria</i> spp	6% (30/508)	6% (39/691)	6% (69/1199)
% total de sites positifs en <i>Listeria</i> spp	15% (76/508)	11% (73/691)	12% (149/1199)

En découpe les sites accessibles sont également plus contaminés que les inaccessibles, tant en *Listeria*, respectivement 18 % et 14%, qu'en *Listeria monocytogenes*, respectivement 10% et 6%, toutefois ces différences ne sont pas statistiquement significatives (tests du  $\chi^2$  ;  $p > 0,05$ ) (tableau 26).

Tableau 26 : Contamination en *Listeria* des sites de découpe selon leur accessibilité

	Sites accessibles	Sites inaccessibles	Total des sites
% de positifs en <i>Listeria monocytogenes</i>	10% (37/358)	6% (29/466)	8% (66/824)
% de positifs en autres <i>Listeria</i> spp	8% (28/358)	8% (38/466)	8% (66/824)
% total de sites positifs en <i>Listeria</i> spp	18% (65/358)	14% (67/466)	16% (132/824)

En ressuage les mêmes tendances se constatent. Les sites accessibles sont significativement plus contaminés en *Listeria* que les inaccessibles, 7% contre 3% (test du  $\chi^2$ ;  $p = 0,03$ ). En *Listeria monocytogenes* cette différence existe aussi, 6% des accessibles contaminés contre 2% des inaccessibles, mais elle n'est pas significative statistiquement (test exact de Fisher  $p = 0,09$ ) (tableau 27).

Tableau 27: Contamination en *Listeria* des sites de ressuage selon leur accessibilité

	Sites accessibles	Sites inaccessibles	Total des sites
% de positifs en <i>Listeria monocytogenes</i>	6% (9/150)	2% (5/225)	4% (14/375)
% de positifs en autres <i>Listeria</i> spp	1% (2/150)	0,4% (1/225)	1% (3/375)
% total de sites positifs en <i>Listeria</i> spp	7% (11/150)	3% (6/225)	5% (17/375)

Ces résultats montrent que les sites accessibles, en contact avec les produits, sont particulièrement contaminés et de ce fait que les opérations de nettoyage-désinfection réalisées classiquement ne sont pas suffisantes pour éliminer cette contamination. Ces sites peuvent donc être à l'origine de contamination des produits carnés à la reprise de l'activité.

D'autre part, les résultats sur les sites inaccessibles montrent bien que, même sans contact direct avec les produits, ces zones peuvent être contaminées et qu'en l'absence de nettoyage-désinfection cette contamination pourrait persister. Toutefois aucun typage des souches n'a été réalisé pour déterminer si ce sont les mêmes souches qui ont été retrouvées et ainsi confirmer une persistance de niches ou si ce sont des souches différentes révélant ainsi une recontamination régulière.

### 2.3.2. Nature des sites contaminés

En découpe, les sites les plus contaminés en *Listeria monocytogenes* et autres espèces de *Listeria* sont les tapis, représentant 60% des sites accessibles contaminés en *Listeria monocytogenes* et 43% des sites contaminés en *Listeria* autres (tableau 28). Les chiffonnages des tapis ont été réalisés à l'extérieur et à l'intérieur du tapis. Toutefois certains prélèvements réalisés en dissociant intérieur et extérieur montrent que les deux parties peuvent être aussi bien contaminées l'une que l'autre.

Les portes de frigo avec leurs montants et les poutrelles sont aussi particulièrement contaminées. Aucun des plafonds, chaussettes de ventilation prélevés n'a été trouvé positif en *Listeria*.

En frigo de ressuage, les sites contaminés sont essentiellement les portes d'entrée et sortie des frigo ou des sas, notamment des froids choc négatifs, ainsi que les cabines de brumisation dans le cas des froids positifs en brumisation.

Les portes sont des portes battantes contre lesquelles toutes les carcasses viennent cogner, soit en entrant soit en sortant du frigo, occasionnant ainsi des contaminations croisées. Ce phénomène est d'autant plus important pour les froids choc négatifs qui ne sont pas nettoyés-désinfectés tous les jours.

Dans les froids brumisés, les cabines de brumisation sont munies de bavettes, à l'entrée et à la sortie, plus ou moins bien adaptées à la forme de la carcasse du porc et donc en contact fréquent avec ces dernières et par conséquent exposées aux contaminations croisées. Cependant ces zones sont normalement nettoyées-désinfectées quotidiennement, leur contamination résiduelle signe donc un manque d'efficacité de ces opérations.

Tableau 28 : Répartition des sites positifs en *Listeria* en découpe

Sites	Positifs en <i>L. monocytogenes</i>		Positifs en <i>L. spp</i> autres	
	accessibles	inaccessibles	accessibles	inaccessibles
Tapis (dessus+dessous)	60% (22/37)		43% (12/28)	
Mur (dont affalage)	5% (2/37)	21% (6/29)		21% (8/38)
Poutrelle (dont affalage)		31% (9/29)		34% (13/38)
Portes frigo (pièces et carcasses)		31% (9/29)	7% (2/28)	5% (2/38)
Découenneuses	16% (6/37)		14% (4/28)	
Poteau				16% (6/38)
Affalage (rouleau+montants)			14% (4/28)	
Autre (scie, rails, balancelle, tables ...)	19% (7/37))	17% (5/29)	28% (6/28)	24% (9/38)

## 2.4. Evolution dans le temps de la contamination des locaux en *Listeria*

Aucun typage des souches n'a été réalisé afin de caractériser la persistance de la contamination dans le temps. Toutefois, il est intéressant de suivre, au cours des différentes répétitions, les sites positifs en *Listeria* dans les différents ateliers notamment ceux « fortement contaminés » (tableaux 29 à 31).

On s'aperçoit que la majorité des sites trouvés contaminés en *Listeria* le restent souvent d'une répétition à l'autre et ce malgré les opérations de nettoyage-désinfection intermédiaires. Un tel résultat traduit soit la persistance dans le temps de « niches de contamination » soit la recontamination systématique de certains sites de l'atelier plus à risque. Quoi qu'il en soit le nettoyage-désinfection apparaît comme insuffisamment efficace.

Les sites retrouvés contaminés au cours des différentes répétitions sont aussi bien des sites accessibles, en contact direct avec le produit mais quotidiennement nettoyés et désinfectés, que des sites inaccessibles, sans contact direct avec le produit mais pas nettoyés ni désinfectés tous les jours.

D'autre part, il est intéressant de constater que les sites retrouvés régulièrement contaminés le sont parfois en *Listeria monocytogenes* (et d'autres espèces éventuellement) et parfois uniquement en d'autres espèces de *Listeria*. Ce résultat s'explique aisément par l'écologie commune aux différentes espèces de cette bactérie. Il est donc important, lors de contrôles environnementaux, de considérer la mise en évidence de toutes les *Listeria* comme indicateur de risque de contamination par *Listeria monocytogenes*.

En découpe dans l'atelier 1, deux tiers des échantillons positifs en *Listeria* (20/32) restent contaminés sur plusieurs répétitions (tableau 29).

Par exemple les sites 39-40-41 et 45 trouvés positifs lors de la répétition n° 2 sont à nouveau positifs lors de la répétition n°5, soit 9 mois après, et ce malgré la réalisation entre temps de deux nettoyages-désinfections approfondis.

Tableau 29 : Sites positifs en *Listeria* en découpe dans l'atelier 1

N° de répétition	Moment	Numéro des sites positifs en <i>Listeria</i>	
		<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. spp</i> autres
1	J1		38
2	J2 = J1 + 3 mois	40-41	35-36-39-45
3	J3 = J2 + 3 mois	23-24-32-40-41-44- <u>45</u>	16-21-27-34- <u>36-39-43</u>
4	J4 = J2 + 6 mois > ND° approfondi	23-32-40-41-44	
5	J5 = J2 + 9mois > ND° approfondi	19-23-40- <u>45</u>	<u>39-41</u>

n° : déjà positif en *L. monocytogenes*

n° : déjà positif en *L. monocytogenes* et en *L. spp*.

n° : déjà positif en *L. spp*.

> ND° : après nettoyage-désinfection

Dans l'atelier 8, en découpe, 80% (35/45) des sites positifs en *Listeria* restent contaminés sur plusieurs répétitions. Certains sites sont même retrouvés positifs sur les 2 années de prélèvements (tableau 30).

Tableau 30 : Sites positifs en *Listeria* en découpe dans l'atelier 8

N° de répétition	Moment	Numéro des sites positifs en <i>Listeria</i>	
		<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. spp</i> autres
1	J1	27-29-30-34	17-28-37-43-44
2	J2 = J1 + 3 mois	21-27-34-39- <del>44</del> -45	29-35- <del>37</del> -38
3	J3 = J2 + 4 mois > ND° approfondi	<u>17</u> -27-29-34-39-44-45	
4	J4 = J2 + 12 mois > ND° approfondi	39b-45-45b	<u>17-35-39-44</u>
5	J5= J4 + 1mois	<u>17-34-39-39b</u>	<u>29</u>
6	J6= J5 + 3 mois = J1 + 2 ans	<u>17-21-29-34-39b</u>	27- <u>39</u>

n° : déjà positif en *L. monocytogenes*

n° : déjà positif en *L. monocytogenes* et en *L. spp.*

n° : déjà positif en *L. spp.*

> ND°: après nettoyage-désinfection

Les mêmes constats peuvent être faits en frigo de ressuage (tableau 31).

Dans l'atelier 4, 63% (5/8) des sites contaminés le restent sur plusieurs répétitions malgré le nettoyage-désinfection approfondi.

Tableau 31 : Sites positifs en *Listeria* en ressuage dans l'atelier 4

N° de répétition	Moment	Numéro des sites positifs en <i>Listeria</i>	
		<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. spp</i> autres
1	J1	12 -15	
2	J2 = J1 + 3 mois	15	
3	J3= J2 + 3 mois	1 – 12	
4	J4 = J3 + 7 mois > ND° approfondi	3 – 5 - 15	

## 2.5. Résultats des boîtes contact pour la Flore Mésophile Totale

La moitié des sites (672/1350) contrôlés après les opérations de nettoyage-désinfection, découpe et ressuage réunis, a de bons résultats en boîtes contact selon la grille d'interprétation décrite au 1-3-2-2 (tableau 32). Un tiers (405/1350) par contre a des résultats très mauvais avec plus de 150 colonies/boîte. La répartition des résultats est globalement bimodale, « peu contaminé » ou « très contaminé » en Flore Totale.

Parmi ces sites contrôlés en boîtes contact on compte des sites accessibles, qui ont été nettoyés et désinfectés avant le contrôle boîtes contact, et des sites inaccessibles qui eux n'ont pas été nettoyés-désinfectés. Les sites accessibles sont significativement moins contaminés en flore totale que les inaccessibles (test du  $\chi^2$  ;  $p = 0,012$ ) (tableau 32): 55% des sites accessibles sont en note 1 contre 46% des inaccessibles et respectivement 28% contre 32% en note 4. Les opérations de nettoyage-désinfection diminuent donc en moyenne le niveau de contamination des surfaces.

Tableau 32 : Résultats de dénombrement de la Flore Mésophile Totale par boîtes contact selon l'accessibilité des sites, découpe et ressuage confondus

	% (nb) d'échantillons <i>n total = 1350</i>			
	Note1=Bon <10 UFC/20cm <sup>2</sup>	Note2=Moyen 10 à 49 UFC/20cm <sup>2</sup>	Note3=Mauvais 50 à 150 UFC/20cm <sup>2</sup>	Note4=Très Mauvais >150 UFC/20cm <sup>2</sup>
Sites accessibles n=566	55% (311)	8% (48)	9% (50)	28% (157)
Sites inaccessibles n=784	46% (361)	11% (83)	12% (92)	32% (248)
Total	50% (672)	10% (131)	10% (142)	30% (405)

Cette tendance est encore plus marquée lorsque l'on considère uniquement la découpe : 61% (237/391) des accessibles en note 1 contre 49% (254/515) des inaccessibles et 24% (94/391) des accessibles en note 4 contre 30% (154/515) des inaccessibles (test du  $\chi^2$  ;  $p = 0,006$ ).

Par contre en ressuage aucune différence significative n'existe selon l'accessibilité des sites, dans les deux cas environ 45% des sites sont en note 1 et environ 30% en note 4. Ce résultat s'explique peut-être par le fait que les sites accessibles de ressuage incluent des sites non nettoyés-désinfectés des froids chocs négatifs.

## 2.6. Résultats en ATP

Afin d'interpréter les résultats d'ATP aucune préconisation n'existe. Nous avons défini des classes en nous basant sur les quartiles. C'est à dire que chacune des quatre classes définies contient 25% des échantillons. Nous avons donc obtenu les classes d'interprétation suivantes :

- Classe 1:  $\leq 180$  URL/25 cm<sup>2</sup> : organiquement propre - bon nettoyage
- Classe 2: 181-950 URL/ 25 cm<sup>2</sup> : moyennement propre - nettoyage moyen
- Classe 3: 951-7400 URL: organiquement sale - mauvais nettoyage
- Classe 4:  $> 7400$  URL/25 cm<sup>2</sup> : organiquement très sale - pas de nettoyage

Sur l'ensemble des sites contrôlés dans l'étude, la propreté organique des sites accessibles est significativement différente de celle des inaccessibles (test du  $\chi^2$  ;  $p < 0,0001$ ) (tableau 33). Il y a davantage de sites propres ( $\leq 180$  URL) dans les inaccessibles que dans les accessibles, 29% contre 20%, mais il y a aussi plus de sites très sales ( $> 7400$  URL) dans les inaccessibles, respectivement 28% contre 21%. Une explication pourrait être que les sites inaccessibles n'étant pas en contact direct avec les produits carnés, sont moins souillés organiquement. Cependant vu l'absence de nettoyage régulier il s'accumule avec le temps un nombre non négligeable de sites fortement contaminés organiquement.

Tableau 33 : Résultats d'ATP-métrie selon l'accessibilité des sites, découpe et ressuage confondus

	% (nb)d'échantillons <i>n total = 1292</i>			
	Bon $\leq 180$ URL	Moyen 181-950 URL	Mauvais 951-7400 URL	Très Mauvais $> 7400$ URL
Sites accessibles n=545	20% (111)	30% (163)	29% (158)	21% (113)
Sites inaccessibles n=747	29% (215)	21% (160)	22% (162)	28% (210)
Total	25% (326)	25% (323)	25% (320)	25% (323)

Lorsque l'on ne considère que la découpe la même tendance existe, 33% (161/493) des inaccessibles contre 22% (82/381) des accessibles sont organiquement propres et respectivement 29% (143/493) contre 14% (53/381) sont très sales (test du  $\chi^2$  ;  $p < 0,0001$ ).

En ressuage aucune différence significative de propreté entre accessibles et inaccessibles n'est mise en évidence (test du  $\chi^2$  ;  $p = 0,4$ ).

## 2.7. Corrélation entre ATP et boîtes contact

En laboratoire il est possible d'établir une corrélation entre une culture bactérienne et l'ATP-métrie. En industrie par contre, dans le cadre du contrôle de l'hygiène des surfaces, il est hasardeux de vouloir établir une telle corrélation.

Toutefois, dans notre étude les coefficients de corrélation obtenus entre ces deux techniques sont assez bons, de l'ordre de 0,5 (tableau 34). Un lien existe bien entre les valeurs d'ATP et le niveau de contamination en Flore Totale des surfaces. Un tel

résultat est tout à fait logique puisque l'efficacité de la désinfection, contrôlée par boîte contact, dépend de la qualité du nettoyage, contrôlé par l'ATP.

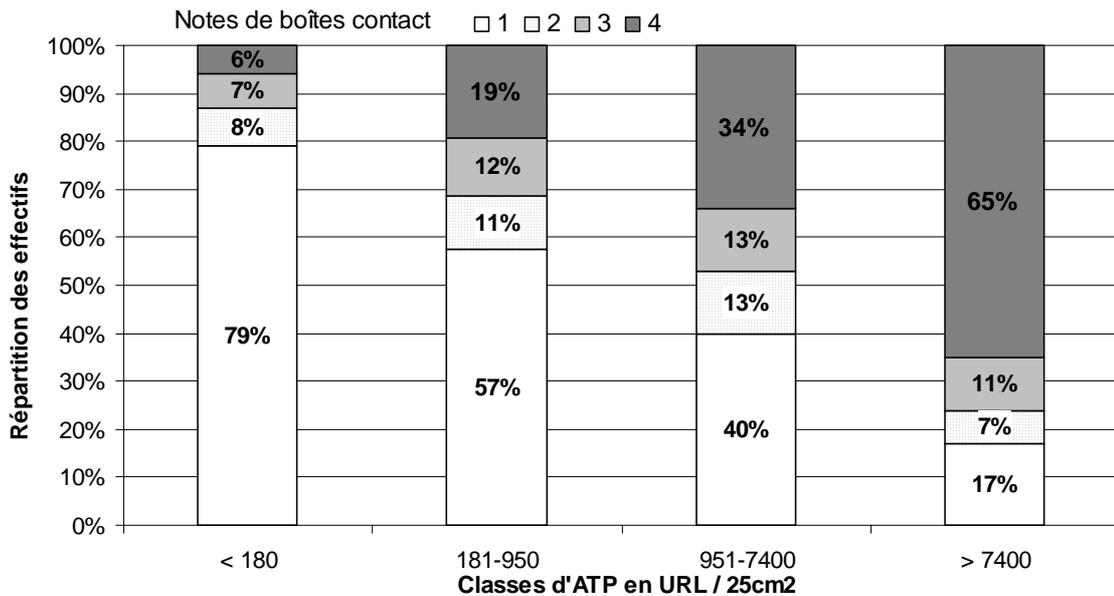
Tableau 34 : Corrélation entre ATP-métrie et boîtes contact

(n=1280)	Log ATP	Classes ATP
Log Boîtes Contact	0.54 ***	0.51 ***
Note Boîtes Contact	0.54 ***	0.51 ***

\*\*\* significatif au seuil  $p < 0,0001$

Après mise en classe il est intéressant de regarder la répartition des résultats ATP selon les résultats boîtes contact et inversement. Les résultats boîtes contact sont différents selon les classes d'ATP (test du  $\chi^2$  ;  $p < 0,0001$ ) (graphique 1). Cependant une tendance générale s'observe. Plus le résultat en ATP est élevé plus la contamination en Flore Totale est importante.

Graphique 1 : Répartition des notes de boîtes contact en fonction des classes d'ATP



Dans la classe  $\leq 180$  URL, c'est à dire sur les surfaces très propres, 79% (254/320) des sites ont un niveau de contamination en flore totale très faible (note 1). Sur ces surfaces bien nettoyées la désinfection a une bonne efficacité. Toutefois 13% (41/320) de ces surfaces très propres organiquement ont de mauvais résultats microbiologiques (note 3 et 4 soit 50 colonies au moins / boîte). Soit la désinfection y a été mal réalisée soit pas du tout réalisée c'est le cas des sites inaccessibles.

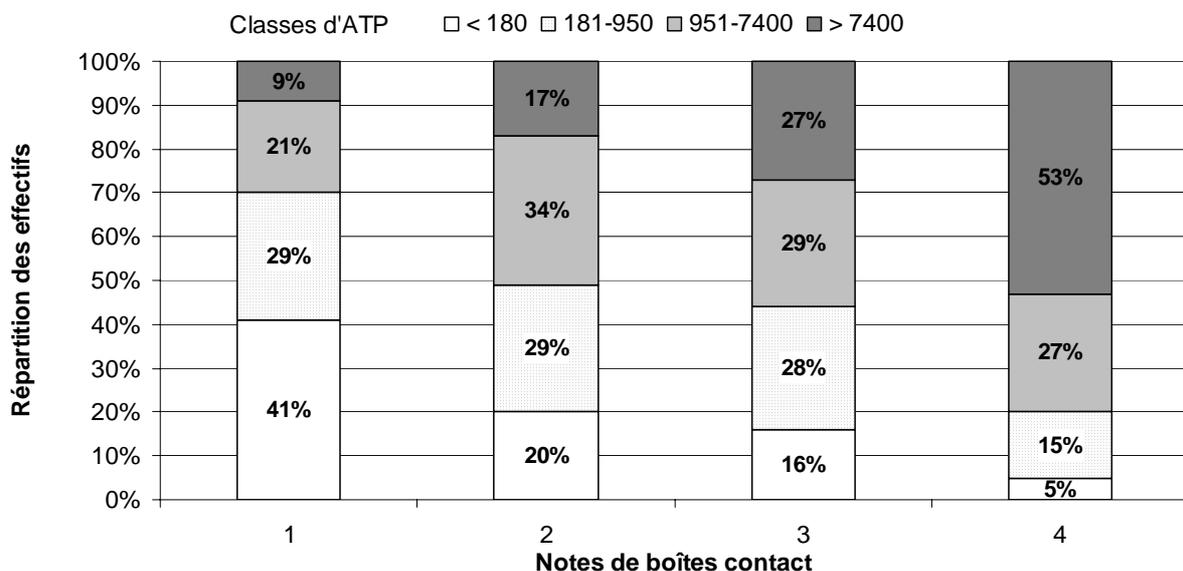
Dans la classe  $> 7400$  URL les surfaces sont très souillées par de la matière organique. La désinfection ne sera donc pas efficace en théorie. Effectivement 76% (246/322) des sites sont très contaminés en flore totale (notes 3 et 4). Cependant 17% (54/322) des sites sont peu contaminés (note 1). Dans ces cas, malgré un

mauvais nettoyage une bonne désinfection a pu être réalisée. Néanmoins, la présence de matière organique représente un facteur de risque pour la multiplication ultérieure de micro-organismes.

Pour la classe intermédiaire, 951-7400 URL, considérée comme organiquement sale, la situation est moins tranchée. La moitié des sites (47%=149/320) à un niveau de contamination en flore totale mauvais à très mauvais (note 3 et 4).

La répartition des classes d'ATP selon les notes de boîtes contact montre les mêmes tendances (graphique 2).

Graphique 2: Répartition des classes d'ATP en fonction des notes de boîtes contact



Pour les boîtes contact de note 1, 70% (436/618) proviennent de surfaces propres à moyennement propres ( $\leq 950$  URL). Un tiers (182/618) des boîtes contact de note 1 concerne des sites qui pourtant avaient été mal nettoyés ( $> 950$  URL d'ATP). La désinfection a dans ce cas pu compenser le mauvais nettoyage.

Pour les boîtes contact de note 4, 80% (318/398) proviennent de surfaces sales ( $> 950$  URL).

Une contamination organique élevée est donc un facteur de risque important de mauvaise désinfection ultérieure. Les classes d'ATP définies dans notre étude semblent assez pertinentes.

Dans le cadre d'un contrôle du nettoyage les préconisations suivantes pourraient être faites :

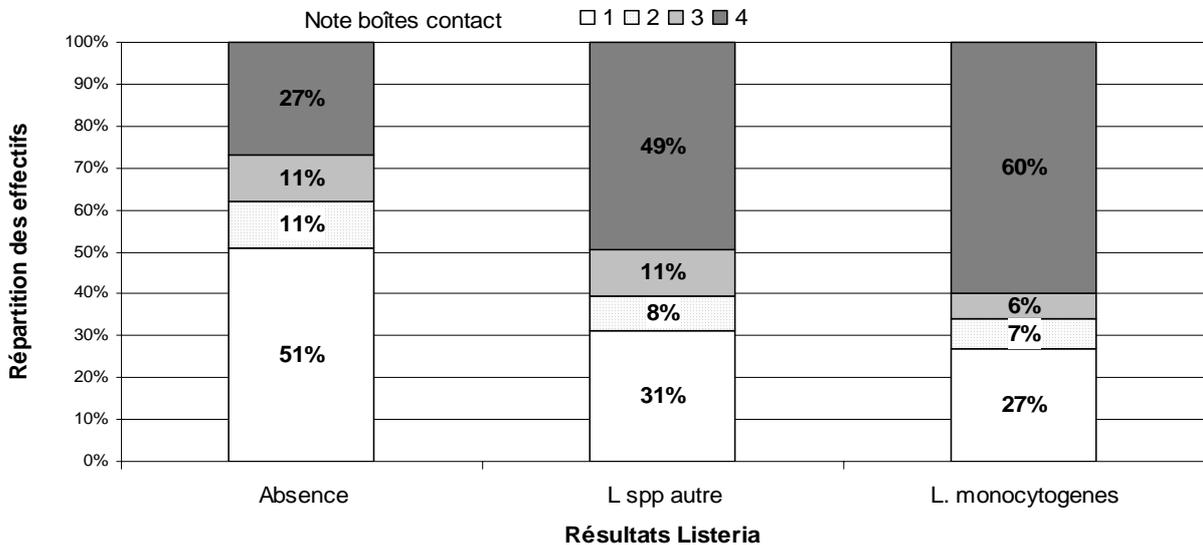
- absence de sites supérieurs à 7400 URL/25cm<sup>2</sup>
- moins de 20% de sites à 951-7400 URL/25cm<sup>2</sup>

## 2.8. Lien entre les résultats *Listeria* et les résultats de boîtes contact

Dans cette partie nous avons pris en compte l'ensemble de *Listeria* pour deux raisons :

- d'une part la répartition des sites positifs en *Listeria* spp et des sites positifs en *Listeria monocytogenes* selon les classes de boîtes contact est similaires (graphique 3),
- d'autre part nous avons vu (cf. 2-4) que la présence dans l'environnement de *Listeria* autres que *monocytogenes* est un indicateur de risque. En effet les sites contaminés en *Listeria monocytogenes* sont aussi régulièrement retrouvés contaminés en *L. spp* autres.

Graphique 3 : Répartition des classes de boîtes contact en fonction des résultats *Listeria monocytogenes* et autres *Listeria* spp.

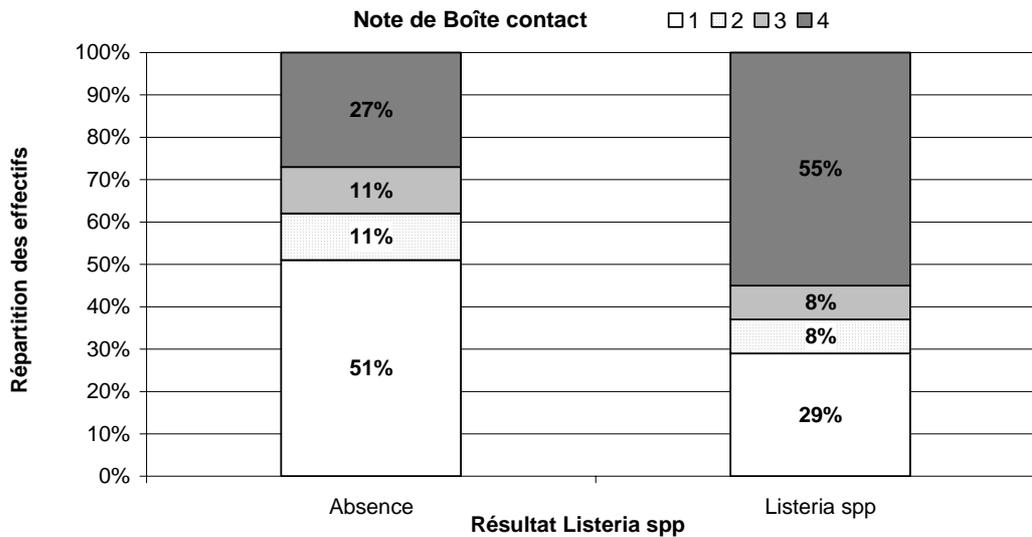


Plus de la moitié (55%=86/156) des sites contaminés en *Listeria* a un niveau très mauvais en boîte contact avec une note 4. Près de deux tiers (63%=99/156) des sites contaminés en *Listeria* ont un résultat boîte contact au moins mauvais (note 3 et 4). Toutefois 29% (45/156) des sites contaminés en *Listeria* ont quand même un résultat boîte contact très bon (note 1) (graphique 4).

Cette répartition est significativement différente de celle constatée pour les sites non contaminés en *Listeria* (test du  $\chi^2$   $p < 0,0001$ ) dont la moitié (51%=524/1027) a un bon résultat en flore totale (note 1) et moins d'un tiers (27%=280/1027) est très mauvais en flore totale avec une note boîte contact de 4.

Un niveau de contamination élevé en flore totale, notamment des résultats de note 4, supérieur à 150 UFC/ 20cm<sup>2</sup>, semble être un facteur de risque de présence de *Listeria*. Mais il n'est pas très discriminant.

Graphique 4 : Répartition des classes de boîtes contact en fonction des résultats *Listeria*



Lorsque l'on regarde la note globale de boîte contact des différentes répétitions dans les ateliers et les résultats *Listeria* le lien n'est pas aussi net entre les deux (tableau 35).

Des notes globales de boîtes contact mauvaises, de 2 ou plus, sont parfois associées à des contaminations élevées en *Listeria monocytogenes* : cas de l'atelier 8 répétitions 2 et 3. Mais ce n'est pas toujours le cas, comme dans l'atelier 5 qui a de très mauvais résultats boîtes contact en note globale mais pas de *Listeria monocytogenes* dans l'environnement.

Des notes globales supérieures à 2 ne sont pas toujours immédiatement corrélées à de mauvais résultats *Listeria* mais elles en sont annonciatrices : cas de l'atelier 1 répétitions 1,2 et 3.

Par ailleurs les nettoyages-désinfections approfondis peuvent améliorer les résultats boîte contact sans forcément améliorer simultanément les résultats en *Listeria* : cas de l'atelier 1, répétition 4 et 5.

Il semblerait qu'un « temps de latence » existe entre les résultats de boîte contact et la présence de *Listeria monocytogenes* dans l'environnement.

Afin d'éliminer les *Listeria* de l'environnement un nettoyage-désinfection approfondi ponctuel ne semble pas suffisant. Les procédures hygiéniques rigoureuses doivent être maintenues dans le temps.

Tableau 35 : Notes globales de boîtes contact et pourcentages de présence de *Listeria monocytogenes* par répétition en découpe (exemple de 4 ateliers)

Atelier	Répétition	Note globale Boîte Contact	% de positifs en <i>L. monocytogenes</i>
1	1	2,0	0%
	2	2,8	7%
	3	3,0	30%
	4 > ND approfondi	1,7	50%
	5 > ND approfondi	1,3	30%
8	1	3,5	13%
	2	3,2	30%
	3 > ND approfondi	3,0	70%
	4 > ND approfondi	1,9	27%
	5	2,5	29%
	6	2,8	45%
2	1	1,3	0%
	2	1,1	3%
	3	1,3	0%
5	1	3,0	7%
	2	3,0	3%
	3	2,8	0%

### 2.9. Lien entre les résultats *Listeria* et les résultats ATP

Pour les mêmes raisons que vues précédemment nous considérons l'ensemble des *Listeria*.

Près de la moitié (47%=73/156) des sites contaminés en *Listeria* sont organiquement très sales (> 7400 URL). Deux tiers (65%=101/156) des sites contaminés en *Listeria* sont dans les classes sales et très sales (>950 URL) (graphique 5).

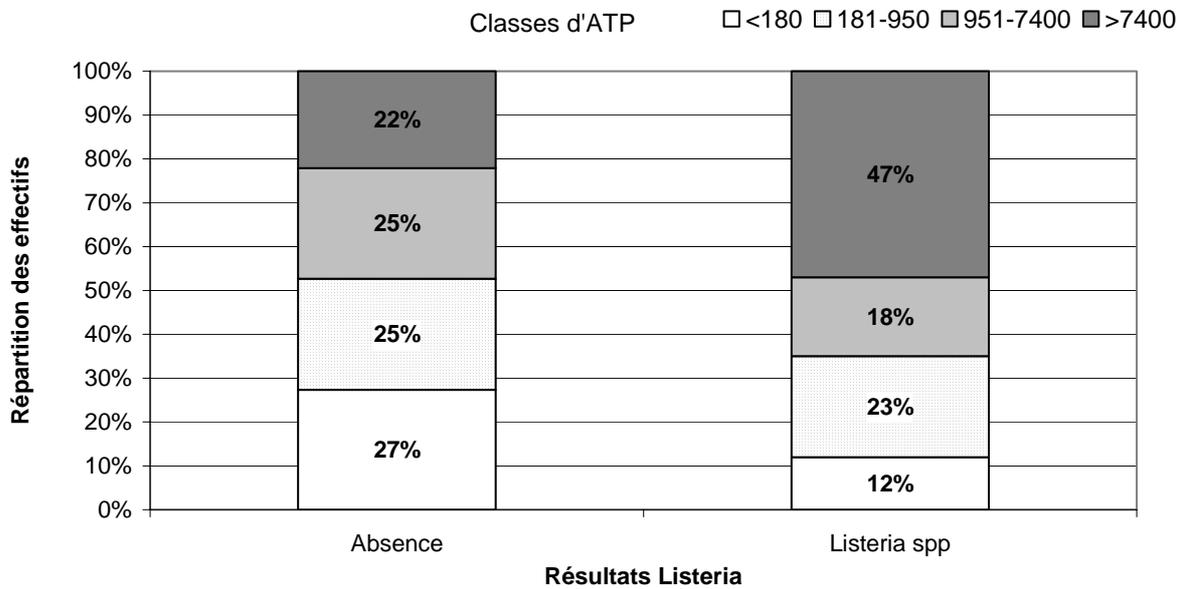
Cette répartition est significativement différente pour les sites non contaminés dont seulement 22% (227/1027) sont très sales et plus de la moitié (52%=541/1027) est propre ou moyennement propre ( $\leq 950$  URL) (test du  $\chi^2$   $p < 0,0001$ ).

Une présence importante de souillure organique est donc un facteur de risque de présence de *Listeria* mais pas très discriminant non plus.

Lorsque l'on croise les résultats ATP, boîtes contact et *Listeria*, 62% (97/156) des sites contaminés en *Listeria* ont de très mauvais résultats ATP (>7400 URL) ou boîtes contact (note 4). Cette catégorie englobe 40% (471/1183) de l'ensemble des sites étudiés.

Pour identifier les sites à risque prendre ce critère « note 4 en boîte contact ou ATP > 7400 URL » n'apporte pas plus d'information que prendre uniquement un critère boîte contact « note  $\geq 3$  » qui permet de détecter 63% des sites positifs en *Listeria* et qui ne concerne lui aussi que 40% de tous les sites étudiés.

Graphique 5 : Répartition des classes d'ATP en fonction des résultats *Listeria*



### 3. Discussion conclusion

Le taux de présence de *Listeria monocytogenes* sur les surfaces des locaux de ressuage et de découpe, après nettoyage-désinfection est apparue faible avec respectivement 4% (14/375) et 8% (66/824) des surfaces positives. Ces résultats sont encourageants et signent une évolution favorable par rapport à des études antérieures qui avaient montré respectivement 30% et 24% des sites de ressuage et de découpe contaminés après nettoyage-désinfection (Corrégé, 1997). Les procédures de nettoyage-désinfection dans les entreprises d'abattage et découpe de porc ont été certainement améliorées.

Des différences importantes de contamination en *Listeria monocytogenes* existent entre les ateliers. Certains ateliers restent à des niveaux de contamination très faibles d'autres par contre connaissent d'importantes dérives et atteignent des niveaux de contamination élevés. Certaines séries de contrôle détectent après nettoyage-désinfection jusqu'à 70% (7/10) de sites contaminés en découpe et 60% (3/5) en ressuage, sur des sites ciblés.

La contamination environnementale par les *Listeria* persiste dans certains ateliers pendant plusieurs mois. Il s'agit soit de persistance de niches soit de recontamination régulière de certains sites à risque. Les sites retrouvés régulièrement contaminés le sont alternativement soit en *monocytogenes* soit en d'autres espèces. Il est donc important lors d'un contrôle de *Listeria* dans l'environnement de prendre en compte toutes les espèces mises en évidence.

Les opérations de nettoyage désinfection approfondies mise en place de façon ponctuelle dans les entreprises fortement contaminées n'ont quasiment jamais été efficaces pour éliminer les *Listeria* de l'environnement. Pourtant *Listeria* n'est pas un germe particulièrement résistant aux désinfectants.

Pour minimiser le risque de présence de *Listeria monocytogenes* dans l'environnement de production il semble nécessaire de mettre en place de façon continue des procédures rigoureuses de nettoyage-désinfection, se focalisant notamment sur les points critiques. Un certains temps d'application de ces procédures semble nécessaire pour « rénover » les surfaces, peut-être pour enlever des éventuels biofilms qui seraient favorables à la survie des bactéries. En effet des cellules de *Listeria monocytogenes* peuvent garder leur cultivabilité pendant au moins 1 mois sur des surfaces encrassées (Giovannacci, 1999).

La motivation des responsables et des équipes de nettoyage-désinfection est un élément apparu comme très important dans la réussite des opérations mises en place.

Ces éléments sont en accord avec les résultats de travaux danois (Danish Meat Research Institute, 2000) qui concluent que l'introduction ponctuelle d'une étape supplémentaire de nettoyage-désinfection (action mécanique, désinfection très méticuleuse etc...). ne suffit pas à elle seule à éliminer *Listeria monocytogenes* dans un environnement industriel. Il est cependant possible de minimiser le risque grâce à la mise en place d'un programme de nettoyage-désinfection s'intéressant particulièrement aux points critiques et au maintien d'une rigueur continue dans la réalisation de ces opérations.

En ce qui concerne les autres méthodes de contrôle des surfaces les résultats boîtes contact et ATP sont assez bien corrélés. L'ATP toutefois apporte une information supplémentaire, elle permet de contrôler l'efficacité du nettoyage et ainsi de faire la dichotomie entre la phase de nettoyage et la phase de désinfection. Les informations apportées par l'ATP-métrie sur la propreté des surfaces sont importantes pour améliorer le résultat de la désinfection. En effet 80% des sites ayant un très mauvais résultat en boîte contact étaient sales à très sales. Et inversement 70% des sites ayant un très bon résultat boîtes contact étaient au moins propres.

Un lien existe entre les résultats d'ATP-métrie et des boîtes contact et les recherches de *Listeria* dans l'environnement. Ces méthodes peuvent être utilisées comme indicateurs de risque notamment parce que ce qu'elles sont moins coûteuses que les analyses *Listeria*.

En tant qu'indicateur de risque de contamination environnementale par *Listeria* les deux méthodes ATP et boîtes contact sont de performances équivalentes, ce qui paraît logique vue leur corrélation. En boîtes contact le critère note  $\geq 3$  ( $> 50$  colonies/boîtes) permet de détecter 63% des sites contaminés en *Listeria*. En ATP le critère  $> 950\text{URL}/25\text{cm}^2$  permet de détecter 65% des sites contaminés en *Listeria*. Ces deux critères concernent chacun 40% et 50% de l'ensemble des sites de l'étude. Croiser des critères ATP et boîtes contact n'apporte pas plus d'information et est assez contraignant au niveau pratique car cela nécessite une multiplication des opérations et du matériel. Le choix entre l'une ou l'autre des méthodes dépendra de la politique de l'entreprise en terme de contrôle de l'hygiène.

Pour les boîtes contacts des notes globales d'un atelier régulièrement mauvaises ( $\geq 2$ ) sont aussi des indicateurs de risque.

Bien qu'indicateurs de risque l'ATP-métrie et les boîtes contact ne peuvent se substituer à un contrôle des *Listeria* dans l'environnement par chiffonnage.

Dans le cadre d'un « contrôle environnemental *Listeria* » les quelques préconisations suivantes peuvent être faites.

- Les prélèvements sont réalisés par chiffonnage avec une chiffonnette de taille « suffisante » ex : 32\*40 cm (pas une gaze stérile du commerce)
- La surface prélevée doit être importante d'au moins 1m<sup>2</sup> ou de l'ensemble de l'outil
- Le prélèvement est réalisé en faisant des allers-retours successifs horizontaux, verticaux et en diagonale en appliquant une pression suffisante
- L'analyse réalisée sur les chiffonnettes est une recherche de *Listeria* spp avec identification *monocytogenes* ou spp.
- Les sites à contrôler en priorité sont les sites accessibles en contact régulier avec les produits notamment les tapis de découpe dessus et dessous, les portes battantes et les cabines de brumisation dans les ressuges. Cependant certains sites inaccessibles méritent aussi d'être contrôlés notamment les portes de frigo en découpe. Un ratio de 2/3 de sites accessibles et 1/3 d'inaccessibles pourrait être envisagé.
- Les sites à contrôler en priorité sont également ceux ayant des résultats régulièrement mauvais en boîte contact (note  $\geq 3$ )

- Le nombre de sites à contrôler est variable selon la taille de l'entreprise. De plus, le coût des analyses *Listeria* est un facteur limitant. Toutefois un minimum de 10 sites / local / contrôle semble indispensable à respecter.

Ces différents éléments devraient permettre d'aider les industriels de l'abattage-découpe de porc à mettre en place des contrôles *Listeria* dans leur environnement de production. Ces contrôles s'intégrant pleinement dans la gestion du risque de contamination des produits porcs par *Listeria monocytogenes*.

## CONCLUSION GENERALE

La sécurité sanitaire des aliments constitue une des préoccupations majeures des consommateurs. Pour répondre à cette attente, les industriels de la filière porcine doivent maîtriser la contamination des produits par les bactéries pathogènes. Parmi celles-ci : *Listeria monocytogenes*.

La contamination des carcasses et pièces de découpe de porc par *Listeria monocytogenes* est principalement due à des bactéries implantées dans l'environnement industriel. Notre étude a montré que, en dépit de progrès importants réalisés ces dernières années en matière de nettoyage-désinfection, les locaux de ressuage et de découpe de porc sont encore contaminés en *Listeria monocytogenes* ce qui constitue un risque de contamination pour les produits.

Il est donc important que les industriels réalisent des contrôles environnementaux appropriés pour détecter les *Listeria* et mettent en place, si nécessaire, un programme continu de nettoyage-désinfection visant particulièrement les sites critiques.

## Références bibliographiques

- 1) Adesiyun, A.A., and Krishnan, C. (1995). Occurrence of *Yersinia enterocolitica* O:3, *Listeria monocytogenes* O:4 and thermophilic *Campylobacter spp.* in slaughter pigs and carcasses in Trinidad. *Food Microbiology*, **12**: 99-107.
- 2) Anonymous (1998). Le plan de surveillance 1993-1996 de la contamination des aliments par *Listeria monocytogenes*. Le point sur ... n°9 DGCCRF, Ministère de l'Economie, des Finances et de l'Industrie
- 3) Audurier, A., Rocourt, J. and Courtieu, A.L. (1977). Isolement et caractérisation de bactériophages de *Listeria monocytogenes*. *Annales de Microbiologie*. (Institut Pasteur), **128**, 185-198.
- 4) Autio, T., Sateri, T., Fredriksson-Ahomaa, M., Rahkio, M., Lunden, J. et Korkeala, H. (2000). *Listeria monocytogenes* contamination pattern in pig slaughterhouse. *Journal of food protection*, **63**, 10, 1438-1442.
- 5) Berche, P. (1991). Pouvoir pathogène de *Listeria monocytogenes* : stratégie de survie in vivo d'une bactérie à croissance intracellulaire. *Compte-rendus de la conférence internationale : Listeria et sécurité alimentaire*, Laval, France, 13-14 juin 1991, Asept Editeur, Laval, 77-81.
- 6) Berche, P. (1999). Physiopathologie et diagnostic bactériologique des infections materno-infantiles à *Listeria monocytogenes*. *Maladies mitochondriales. - Médecine thérapeutique / Pédiatrie*. Vol. 2, Numéro 1, : 33-39.
- 7) Bibb, W.K., Gellin, B.G., Weaver, R., Schwartz, B., Plikaytis, B.D., Reeves, M.W., Pinner, R.W. and Broome, C.V. (1990). Analysis of clinical and food-borne isolates of *Listeria monocytogenes* in the United States by multilocus enzyme electrophoresis and application of polymorphic of the method to epidemiologic investigations. *Applied and Environmental Microbiology*, **56**: 3126-3129.
- 8) Boerlin, P., Boerlin-Petzold, F., Bannerman, E., Bille, J. and Jemmi, T. (1997). Typing *Listeria monocytogenes* isolates from fish products and human listeriosis cases. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**: 1338-1343.
- 9) Borch, E., Nesbakken, T. et Christensen H. (1996). Hazard identification in swine slaughter with respect to foodborne bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, **30**, 9-25.
- 10) Bréand, S., Fardel, G., Flandrois, J.P., Rosso, L. and Tomassone R. (1998). Model of the influence of time and mild temperature on *Listeria monocytogenes* nonlinear survival curves. *International Journal of Food Microbiology*, **40**: 185-195.
- 11) Brosch, R., Chen, J. and Luchansky, J.B. (1994). Pulsed-field fingerprinting of *Listeria*: identification of genomic division for *Listeria monocytogenes* and their correlation with serovar. *Applied and Environmental Microbiology*, **60**: 2584-2592.
- 12) Buncic, S. (1991). The incidence of *Listeria monocytogenes* in slaughtered animals, in meat, in meat products in Yugoslavia. *International Journal of Food Microbiology*, **12**: 2-3, 173-180.

- 13) Burow, H., Weber, A. and Pottel, J. (1996). Nachweis von Listerien in Kotproben von landwirtschaftlichen Nutztieren und in vom Tierstammenden Lebensmitteln. *Fleischwirtschaft*, **76**:7, 745-748.
- 14) Carlier, V. (1992). *Listeria* dans les denrées alimentaires. Bulletin de liaison du CTSCCV, 4, 2-9.
- 15) Carlier, V. (2000). *Listeria monocytogenes* et filière porcine. *In*: Association Française de Médecine Vétérinaire Porcine : L'assurance qualité en filière porcine : risque ou opportunité, Maisons-Alfort, France, 7-8 décembre 2000, 129-141.
- 16) Catteau, M. (1999). *Listeria monocytogenes*: un problème de méthode d'analyse ? Bulletin de la Société Française de Microbiologie, 14, 99-101.
- 17) Certiviande (1995). Guide de Bonnes Pratiques Hygiéniques en Abattage et Découpe de Porc, Paris : Certiviande, 2000, 49 p.
- 18) Champiat D. et Larpent J.P. (1993). Bio-Chimi-Luminescence, Principes et applications. Masson, Paris.
- 19) Charpentier E. and Courvalin, P. (1999). Antibiotic resistance in *Listeria spp.* Antimicrobial Agents and Chemotherapy, **43**: 2103-2108.
- 20) Cheftel, J.C. and Culioli, J. (1997). Effects of High pressure on meat : A review. *Meat Science*, **46**(3): 211-236
- 21) Cheroutre-Vialette, M., Lebert, I., Hebraud, M., Labadie, J.C. and Lebert, A. (1998). Effects of pH and aw stress on growth of *L. monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, **42**: 71-77.
- 22) Conner, D.E., Scott, V.N. and Bernard, D.T. (1990). Growth, inhibition and survival of *Listeria monocytogenes* as affected by acidic conditions. *Journal of Food Protection*, **53**: 652-655.
- 23) Corrége, 1994. Maîtrise de la qualité de la viande de porc : données bibliographiques et étude diagnostique réalisée dans trente abattoirs. Th : Méd.vet. : Toulouse : 1994, n°68, 106p.
- 24) Corrége, I. et Le Roux, A. (1996). Elaboration d'un plan de contrôle de la qualité bactériologique des carcasses et pièces de découpe de porc. Document ITP.
- 25) Corrége, I. (1997). Incidence des opérations d'abattage et de découpe de porc sur la contamination par *Listeria monocytogenes*. *Viandes et produits carnés* 18, 275-282.
- 26) Cottureau, P. et Laval, A. (1972). Les aspects cliniques de la listériose chez les animaux domestiques et de laboratoire. Bulletin de la Société des Sciences Vétérinaires et de Médecine Comparée, **74**, 6, 447-454.
- 27) Danish Meat Research Institute (2000). Rapport annuel, 12-13.
- 28) De Montzey, S., Minvielle, B., Boulard, J., et Le Roux, A. (2001). Traitement spécifique des carcasses de porc par double flambage. Document de l'Institut Technique du porc.
- 29) DGCCRF. (Page consultée le 25 mars 2003). Site du ministère des finances [en ligne]. Adresse URL:  
[http://www.finances.gouv.fr/DGCCRF/consommation/contrôles\\_alimentaires/actions/Listeria0802.htm#presentation](http://www.finances.gouv.fr/DGCCRF/consommation/contrôles_alimentaires/actions/Listeria0802.htm#presentation)

- 30) Donker-Voet, J., (1972). *Listeria monocytogenes*: some chemical and serological aspects. Acta Microbiologica Academiae Scientiarum Hungaricae, 19, 287-291.
- 31) Ericsson, H, Stalhdske, P., Danielsson-Tham, M. –L., Bannerman, E., Bille, J., Jasquet, C., Rocourt, J., et Tham, W. (1995). Division of *Listeria monocytogenes* serovar 4b strains into two groups by PCR and restriction enzyme analysis. Applied and environmental microbiology, 61, 3872-3874.
- 32) Euzéby, J. P. (Site consulté le 9 janvier 2003), Dictionnaire de bactériologie vétérinaire, [en ligne]. Adresse URL : [http :// www.bacdico/garde.html](http://www.bacdico/garde.html)
- 33) Farber, J.M., Sanders, G.W. and Johnston, M.A. (1989). A survey of various foods for the presence of *Listeria* species. Journal of Food Protection, 52, 456-458.
- 34) Farber, J. M. and Peterkin, P.I. (1991). *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. Microbioloy Review, 55, 476-511.
- 35) Farber, J.M., Coates, F. and Daley, E. (1992). Minimum water activity requirements for the growth of *Listeria monocytogenes*. Letters in Applied Microbiology 15, 103-105.
- 36) Fistrovici, E., et Collins-Thompson, D. L. (1990). Use of plasmid profiles and restriction endonuclease digest in environmental studies of *Listeria* spp from raw milk. International Journal of Food Microbiology, 10, 43-50.
- 37) Franciosa, G., Pourshaban, M., Gianfranceschi, M. and Aureli, P. (1998). Genetic typing of human and food isolates of *Listeria monocytogenes* from episodes of listeriosis. European Journal of Epidemiology, 14, 205-210.
- 38) Garcia, J. A., Dominguez, L., Briones, V., Blanco, M., Fernandez-Garayzabal, J. F., Suarez, G. (1990). Revision of the antigenic structure of genus *Listeria*. FEMS Microbiology Letter, 67, 113-120.
- 39) Gary, P. (2002). La congélation des produits modifie-t-elle les résultats d'analyses microbiologiques. Bulletin de liaison du CTSCCV, 12, (3), 3-14.
- 40) George, S.M., Lund, B.M. and Brocklehurst, T.F. (1988). The effect of pH and temperature on initiation of growth of *Listeria monocytogenes*. Letters in Applied Microbiology, 6, 153-156.
- 41) Giovannacci, I. (1999). Origine des *Listeria monocytogenes* et des *Salmonella* présentes sur les produits de découpe de porc. Thèse de doctorat, Université de Bretagne Occidentale.
- 42) Giovannacci, I., Vendevre, 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, 12, 2, 7-18.
- 43) Gobat, P. F. et Jemmi, T. (1990). Epidemiological studies on *Listeria* spp. in slaughterhouses; Fleischwirtschaft, 70, 241-244.
- 44) Goret, P. and Joubert, L. (1976). Epidémiologie pathogénique des listérioses chez les ruminants. Hypothèses de travail. Médecine et Maladies Infectieuses, 6, 21-28.
- 45) Goulet, V. Leonard, J.L. and Celers, J. (1986). Etude épidémiologique de la listériose humaine en France en 1984. Revue d'Epidémiologie et de Santé Publique, 34, 191-195.

- 46)Goulet, V., Rocourt, J., Rebiere, I., Jacquet, C., Moyse C., Dehaumont, P., Salvat, G., Veit, P. (1998). Listeriosis outbreak associated with the consumption of rillettes in France in 1993. *Journal of Infectious Diseases*, **177**,(1), 155-160.
- 47)Goulet, V., Jacquet, Ch., Laurent, E., Rocourt, J., Vaillant, V. et de Valk J. (2001a). La surveillance de la listériose humaine en France en 1999. *Bulletin Epidémiologique hebdomadaire*, n°34/2001.
- 48)Goulet, V., de Valk, H., Pierre, O., Stainer, F., Rocourt, J., Vaillant, V., Jacquet, C. et Desenclos, J. C. (2001b). Effect of Prevention Measures on Incidence of Human Listeriosis, France, 1987-1997. *Emerging Infectious diseases*, **7**, 6, 983-989.
- 49)Graves, L. M., Swaminathan, B., Reeves, M. W., Hunter, S. B., Weaver, R. E., Plykaytis, B. D., et Schutat, A. (1994). Comparison of ribotyping and multilocus Enzyme Electrophoresis for subtyping *Listeria monocytogenes* isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, **32**, 2936-2943.
- 50)Gray, M.L. and Killinger, A.H. (1966). *Listeria monocytogenes* and *Listeria* infections. *Bacteriological Review*,**30**, (2), 309-371.
- 51)Grimont, P. et Bouvet, P. (site consulté le 24 mars 2003). CNR des Salmonella et Shigella : Résumé des rapports d'activité 1999 [en ligne]. Adresse URL : <http://www.pasteur.fr/sante/clre/cadrecnr/salm/salmcncr-rap99.html>
- 52)Hof, H. et Hefner, P. (1988). Pathogenicity of *Listeria monocytogenes* in comparison to other *Listeria* species. *Infection*, **16**, 2, 141-144.
- 53)Huhtanen, C.N., Jenkins, R.K. and Thayer, D.W. (1989). Gamma radiation sensitivity of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, **9**, 610-613.
- 54)Jacquet, Ch., Brouille, F., Saint Cloment, C., Catimel, B. et Rocourt, J. (1999). La listériose humaine en France en 1998. *Bulletin Epidémiologique hebdomadaire*, n°37/1999.
- 55)Jay, J. M. (1996). Prevalence of *Listeria* spp. in meat and poultry products. *Food control*, **7**, 209-214.
- 56)Jonhson, J. L., Doyle, M. P., Cassens, R. G. et schoeni, J. L. (1988). Fate of *Listeria monocytogenes* in tissues of experimentally infected cattle and in hard salami. *Applied and environmental microbiology*, **54**, 497-501.
- 57)Juntilla, J.R., Niemelä, S.I. and Hirn, J. (1988). Minimum growth temperatures of *Listeria monocytogenes* and non-haemolytic *Listeria*. *Journal of Applied Bacteriology*, **65**, 321-327.
- 58)Kerouanton, A., Brisabois, A., Denoyer, E., Dilasser, F., Grout, J., Salvat, G. and Picard, B. (1998). Comparison of five typing methods for the epidemiological study of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, **18**, 61-71.
- 59)Kukharkova, L.L, Boyarshinov, P.K., Adutskovich, V.A. and Perova, P.B. (1960). Data on the hygienic judgement of meat in case of listeriosis. *Veterinariya*, **37**, 74-79.
- 60)Larpent, J.P. (2000). *Listeria*. 2<sup>ème</sup> édition. Paris, Tec et Doc. 165 p.
- 61)Lopes, J.A. (1986) Evaluation of dairy and food plant sanitizers against *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Dairy Science*, **69**, 2791-2796.

- 62) Martin, P. (2001). Panorama épidémiologique des infections à *Listeria monocytogenes*. *In*: Symposium la sécurité sanitaire des aliments : quels enjeux pour l'entreprise, Lille, France, 15-16 Novembre 2001. Lille : Institut Pasteur de Lille.
- 63) McLauchlin, J. (1996). The relationship between *Listeria* and listeriosis. *Food Control*, **7**, (4-5), 187-193.
- 64) Minvielle, B. (2000). L'ATP-métrie en complément du contrôle microbiologique. *Viande et Produits Carnés*, **21**, 1, 11-18.
- 65) Mizutani, H., Iida, T. and Maruyama, T. (1990). Isolation of *Listeria monocytogenes* from intestinal contents and carcasses of cattle and pigs at an abattoir. *Journal of the Japan Veterinary Medical Association*, **43**: 8, 602-605.
- 66) Monk, J.D., Clavero, M.R.S., Beuchat, L.R., Doyle, M.P. and Brackett, R.E. (1994). Irradiation inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in low- and high-fat, frozen and refrigerated ground beef. *Journal of Food Protection*, **57**, 969-974.
- 67) Murray, E.G.D., Webb, R.A. and Swann, M.B.R. (1926). A disease of rabbits characterized by large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n.sp.). *Journal of Pathology and Bacteriology*, **29**, 407-439.
- 68) Nolan, D.A., Chamblin, D.C. and Troller, J.A. (1992). Minimal water activity levels for growth and survival of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. *International Journal of Food Microbiology*, **16**, 323-335.
- 69) Orth, R. and Mrozek, H. (1989). Is the control of *Listeria*, *Campylobacter*, and *Yersinia* a disinfection problem? *Fleischwirtschaft*, **69**, 1575-1576.
- 70) Osterholm, M.T. and Potter, M.E. (1997). Irradiation pasteurisation of solid foods : taking food safety to the next level. *Emerging Infectious Diseases*, **3**, 575-577.
- 71) Pagan, R., Condon, S. and Sala, F.J. (1997). Effects of several factors on the heat-shock-induced thermotolerance of *Listeria monocytogenes*. *Applied and environmental microbiology* **63**: 3225-3232.
- 72) Paterson, J. S. (1940). The antigenic structure of organisms in the genus *Listeria*. *Journal of Pathological Microbiology*, **51**, 427-439.
- 73) Perez-Diaz, J. C., Vincente, M. F. et Baquero, F. (1982). Plasmids in *Listeria*. *Plasmid*, **8**, 112-118.
- 74) Piffaretti, J.C., Kressbuch, H., Aeschbacher, M., Bille, J., Bannerman, E., Musser, J.M., Selander, R.K. and Recourt, J. (1989). Genetic characterization of clones of the bacterium *Listeria monocytogenes* causing epidemic disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **86**, 3818-3822.
- 75) Pirie, J.H.H. (1940). The genus *Listerella* Pirie, *Science*, **91**, 383.
- 76) Potel, J. (1953). Aetiologie der granulomatosis infantis septica. *Wissenschaft. Zeitsch. Martin-Luther-Univ.*, **3**, 341-364.
- 77) Rapport Afssa de la commission d'étude des risques liés à *Listeria monocytogenes*, (2000). 144.p.
- 78) Report on trends and sources of zoonotic agents in the EU, 1998, 120-124.

- 79) Rocourt, J. (1990). *Listeria* et Listériose humaine : la décennie 1979-1989. *Annales de l'Institut Pasteur/Actualités*, 1, 25-30.
- 80) Rocourt, J. (1991). Typage moléculaire de *Listeria monocytogenes*. In : *Listeria* et sécurité alimentaire (Compte-rendu de la conférence internationale des 13/14 juin 1991 à Laval, France), Ed Agmar A, p115-122, Asept, Laval.
- 81) Rocourt, J., Audurier, A., Courtieu, A.L., Durst, J., Ortel, A., Schrettenbrunner, A. and Taylor, A.G. (1985). A multi-centre study on the phage typing of *Listeria monocytogenes*. *Zentralbl. Bakteriolog. Mikrobiol. Hyg. Ser. A*, **259**, 489-497.
- 82) Rocourt, J. et Bille, J. (1997). Foodborne listeriosis. *World Health Statistics Quarterly*, 50, 67-73.
- 83) Rocourt, J. and Jacquet, C. (2000). *Listeria* et listériose. In: Freney J., Renaud F., Hansen W., Bollet C. (eds). *Précis de bactériologie clinique*, Editions Eska 2000, pp. 943-956.
- 84) Ryser, E. T. et Marth, E. H. (1999). *Listeria*, listeriosis and food safety. 2<sup>nd</sup> édition. New York: Marcel Dekker Inc.
- 85) Salvat, G. (2000). *Listeria monocytogenes* en production porcine. Réunion OFIVAL de concertation sur la maîtrise des *Listeria* par la filière porcine, 14 septembre 2000.
- 86) Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., et Erlich H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science*, 239, 487-491.
- 87) Sarrut, S. (1975). La listériose maternofoetale. 1) Les lésions placentaires à propos de 75 observations. *Revue française de Gynécologie Obstétricale*, 70, 711-720.
- 88) Seeliger, H.P.R. and Höhne, K. (1979). Serotyping of *Listeria monocytogenes* and related species. In: *Methods in Microbiology*. Bergan, T. et Norris, JR. (ed), New York : Academic Press, **13**, 31-49.
- 89) Seeliger, H.P.R. and Jones D. (1986). *Genus Listeria Pirie* 1940. In : Sneath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E. and Holt J.H. (eds). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 9<sup>ème</sup> édition. Baltimore: Williams & Wilkins, vol.2, 1235-1245.
- 90) Sielaff, H. von (1968). Die lebensmittelhygienische Bedeutung der Listériose. *Monatsch. Veterinärmed*, **21**, 750-758.
- 91) Skovgaard, N. and Morgen, C.A. (1988). Detection of *Listeria spp.* in faeces from animals, in feeds, and in raw foods of animal origin. *International Journal of Food Microbiology*, **6**, 229-242.
- 92) Skovgaard, N. and Norrung, B. (1989). The incidence of *Listeria spp.* in faeces of Danish pigs and in minced pork meat. *International Journal of Food Microbiology*, **8**, 59-63.
- 93) Sorrells, K.M., Enigl, D.C. and Hatfield, J.R. (1989). Effect of pH, acidulant, time, and temperature on the growth and survival of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, **52**, 571-573.
- 94) Struelens, M. J., et Members of the European Study Group on Epidemiological Markers (ESGEM) (1996). Consensus guidelines for appropriate use and evaluation

of microbial epidemiologic typing systems. *Clinical Microbiology and Infection*, **2**, 2-11.

95)Struillou, L. and Raffi, F. (1997). Listérioses. Encyclopédie Médico-Chirurgicale, (Elsevier, Paris). Maladies Infectieuses, 8-017-R-10, Thérapeutique, 25-039-A-10, pp.7.

96)Sunaga, S., Nakauchi, K., akajima, H., Kataoka, Y and Morozumi, T. (1991). Isolation and some properties of *Listeria* spp. from pigs carcasses at an abattoir. *Journal of the Japan Veterinary Medical Association*, **44**, 10, 1051-1056.

97)Toquin, M.T. and Colin, P. (1994). Prévalence des *Listeria* dans l'environnement des bâtiments d'élevages avicoles. *Veterinary Research*, **25**, 417-418.

98)Toquin, M.T., Michel, Y., Salvat, G., and Colin, P. (1995). Prevalence of *Listeria monocytogenes* in poultry flocks. 12<sup>th</sup> european symposium on the quality of poultry meat. Session on poultry microbiology. Saragoza, Spain, 25-29 September 1995, 205-214.

99)Van den Elzen, A. M. G., et Snijders, J. M. A. (1993). Critical points in meat production lines regarding the introduction of *Listeria monocytogenes*. *The veterinary Quaterly*, **15**, 143-145.

100)Van Renterghem, B., Huysman, F., Rygole, R. And Verstraete, W., 1991. Detection and prevalence of *Listeria monocytogenes* in the agricultural ecosystem. *Journal of applied microbiology*, **71**, 211-217.

101)Vasseur, C., Baverel, L., Hébraud, M. and Labadie, J. (1999). Effect of osmotic, alkaline, acid or thermal stresses on the growth and inhibition of *Listeria monocytogenes*. *Journal of applied microbiology*, **86**, 469-476.

102)Vines, A., Reeves, M. W., Hunter, S., and Swaminathan, B. (1992). Restriction Fragmentt lenght polymorphism in four virulence-associated genes of *Listeria monocytogenes*. *Research in Microbiology*,**143**, 281-294.

103)Verhoye, A. (2002). Recherche et dénombrement de *Listeria* par méthodes normalisées et validées. *In*: Cours de Microbiologie, Hygiène et sécurité des aliments. Accréditation : Le point sur les méthodes normalisées et validées en microbiologie alimentaire. Villeneuve d'Ascq, France, 25-29 Novembre 2002. Villeneuve d'Ascq : Institut Pasteur de Lille, 2002.

104)Vojinovic, G. (1992). The incidence of *Listeria monocytogenes* in slaughtered healthy animals and minced meat. *Acta Veterinaria Beograd*, **42**: 5-6, 329-336.

105)Walker, S.J., Archer, P. and Banks, J.G. (1990). Growth of *Listeria monocytogenes* at refrigeration temperatures. *Journal of Applied Bacteriology*, **68**, 157-162.

106)Weber, A., Potel, J., Schäfer-Schmidt, R., Prell, A. and Datzmann, C. (1995). Untersuchungen zum Vorkommen von *Listeria moncytogenes* in Kotproben von Haus-und Heimtieren. *Zentrablatt für Hygiene und Umweltmedizin*, **198**, (2), 117-123.

107)Weil J.H. (1990). Biochimie générale. 6<sup>ème</sup> ed., Masson, Paris, pp. 114-149.

108)Weis, J. and Seeliger, H.P.R. (1975). Incidence of *Listeria monocytogenes* in nature. *Applied Microbiology*, **5**: 29-32.

## Références normatives

1) Norme NF V08-055 – Afnor (Août 1997) – Microbiologie des aliments. Recherche de *Listeria monocytogenes*. Méthode de routine.

2) Norme NF V08-028-2 (NF EN ISO 11290-2) – Afnor (Août 1998) – Microbiologie des aliments. Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de *Listeria monocytogenes*. Partie2 : Méthode de dénombrement.

Toulouse, 2003

**Nom** : ROSSEL

**Prénom** : Roxane

**Titre** : *Listeria monocytogenes* en abattoir et découpe de porc : contrôle de la contamination environnementale des frigos de ressuage et salles de découpe

**Résumé** :

L'environnement industriel est une source de contamination des produits carnés porcins par *Listeria monocytogenes*. Dans l'étude, en frigos de ressuage et salle de découpe 4% (14/375) et 8% (66/824) des sites contrôlés après nettoyage-désinfection sont positifs en *Listeria monocytogenes*. Les sites en contact avec les produits sont les plus contaminés. Certains sites sont retrouvés contaminés sur plusieurs mois. Il s'agit de recontaminations ou de contamination endémique. Les opérations de nettoyage-désinfection approfondies réalisées ponctuellement ne sont pas efficaces pour éliminer *Listeria monocytogenes* de l'environnement à l'inverse des procédures hygiéniques approfondies conduites régulièrement et visant les sites critiques. Les mesures de l'ATP et de la flore mésophile totale par boîte contact sur les surfaces sont des indicateurs de contamination par *Listeria monocytogenes* mais elles ne sont pas assez discriminantes pour remplacer la recherche des *Listeria* dans l'environnement.

**Mots-Clés** : *Listeria monocytogenes*, porc, abattage, découpe, hygiène

**Title**: *Listeria monocytogenes* in pig slaughterhouses and cutting plants : control of environmental contamination of chilling rooms and cutting rooms

**Abstract**:

Industrial environment is a source of contamination of pork products by *Listeria monocytogenes*. In this study, in chilling and cutting rooms 4% (14/375) and 8% (66/824) of surfaces sampled after cleaning and sanitizing were contaminated by *Listeria monocytogenes*. Surfaces in contact with products are the most contaminated. Some surfaces have been found contaminated for many months because of new contaminations or of endemic contamination. Improved cleaning and sanitizing procedures realised once are not efficient to eliminate *Listeria monocytogenes* from the environment. Such improved procedures realised regularly especially on critical points are efficient. The ATP and total bacteria count methods are indicators of surface contamination by *Listeria monocytogenes* but not discriminative enough to replace test of *Listeria* in the environment.

**Key-Words**: *Listeria monocytogenes*, pig, slaughterhouse, cutting plant, hygiene