

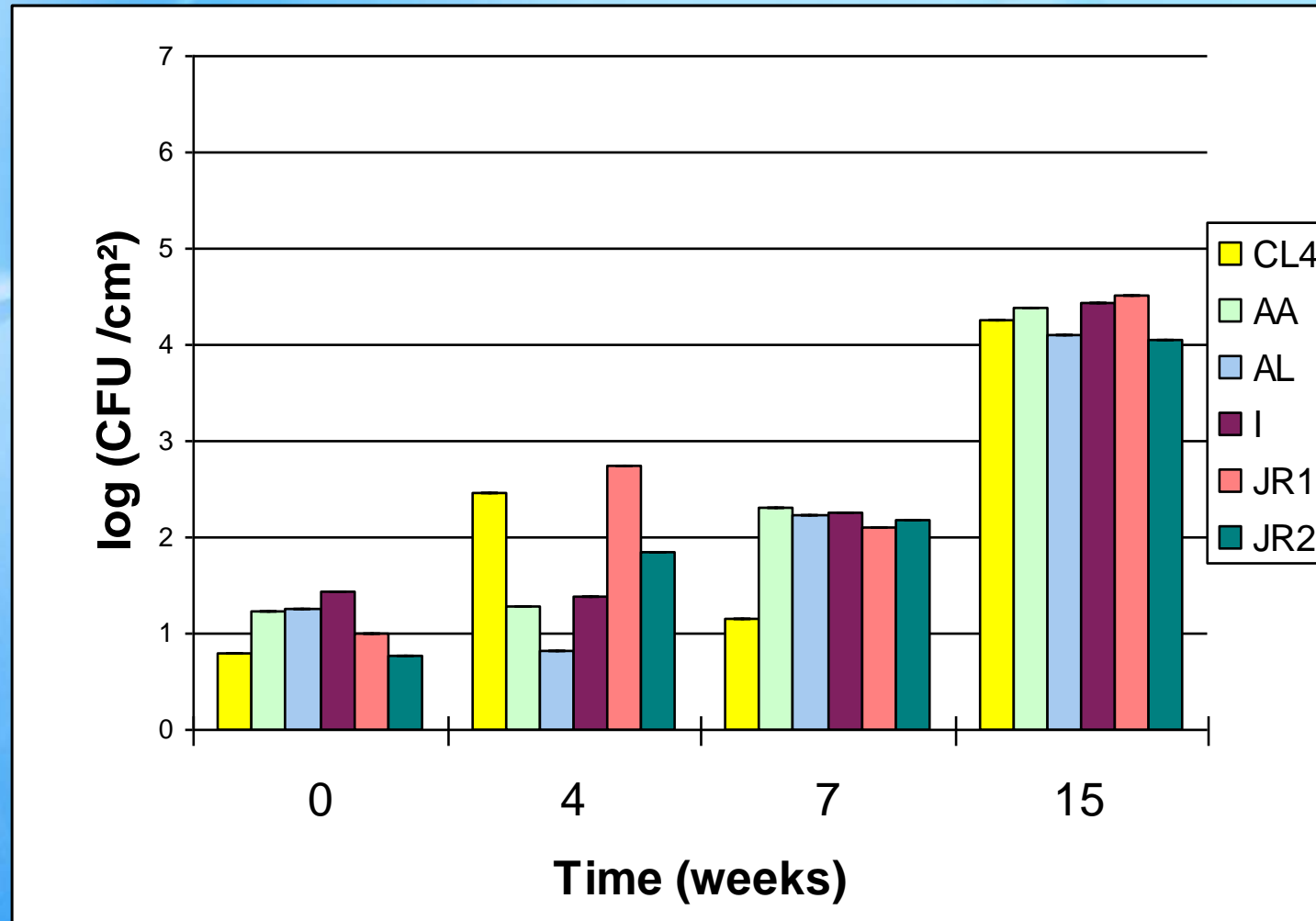


AGENCE FRANÇAISE
DE SÉCURITÉ SANITAIRE
DES ALIMENTS

**Persistance bactérienne dans les environnements
industriels alimentaires et cas de *Listeria
monocytogenes***

Brigitte Carpentier
Octobre 2008

Charge microbienne après nettoyage et désinfection de plusieurs matériaux placés sur le mur d'un atelier de fabrication fromagère (Mettler, 1995)



Microflore cultivable isolée à partir de sols après nettoyage et désinfection (Mettler and Carpentier, 1998)

Viande

Pseudomonas
Staphylococcus
Enterobacter
Flavobacterium
yeasts
Kluyvera

Pâtisserie

yeasts
Corynebacterium
Leuconostoc
Pseudomonas
Acinetobacter
Staphylococcus
Aerococcus
Achromobacter
molds

Lait

Pseudomonas
Staphylococcus

Conforme aux résultats de Holah *et al.* (2002) et Bagge-Ravn *et al.* (2003)

Pathogènes potentiellement persistants dans des environnements alimentaires

(ICMSF, 2002)

- Nombreux cas attestés
 - *Listeria monocytogenes*: fromage, charcuterie, volaille, saumon, crème glacée, etc., ateliers froids
 - Salmonella non typhique: produits secs
 - *Enterobacter sakazakii*: produits laitiers déshydratés (Kandhai *et al.* 2004)
- Des cas ont été décrits
 - *E. coli* O 157:H7 (hachoir à viande de supermarché)
 - *Bacillus cereus* (conduites de lait)
 - etc.

Obtention expérimentale d'une persistance bactérienne

<i>Pseudomonas fluorescens</i> (Peneau <i>et al.</i> 2007)	<i>E. coli</i> O157:H7 (Marouani-Gadri <i>et al.</i> en préparation)
Sol en céramique 4,5 cm ²	Tapis convoyeur en polyuréthane 3,5 cm ²
10°C	20°C
Une seule charge bactérienne dans de l'exsudat de viande	
N&D journalier: alcalin chloré + aldéhyde-ammonium quaternaire, demi concentration minimale recommandée par le fournisseur, pas d'action mécanique ; puis souillure par de l'exsudat de viande	

Plus petite charge bactérienne de l'exsudat de viande permettant d'obtenir la persistance sur des éprouvettes de $\cong 4 \text{ cm}^2$

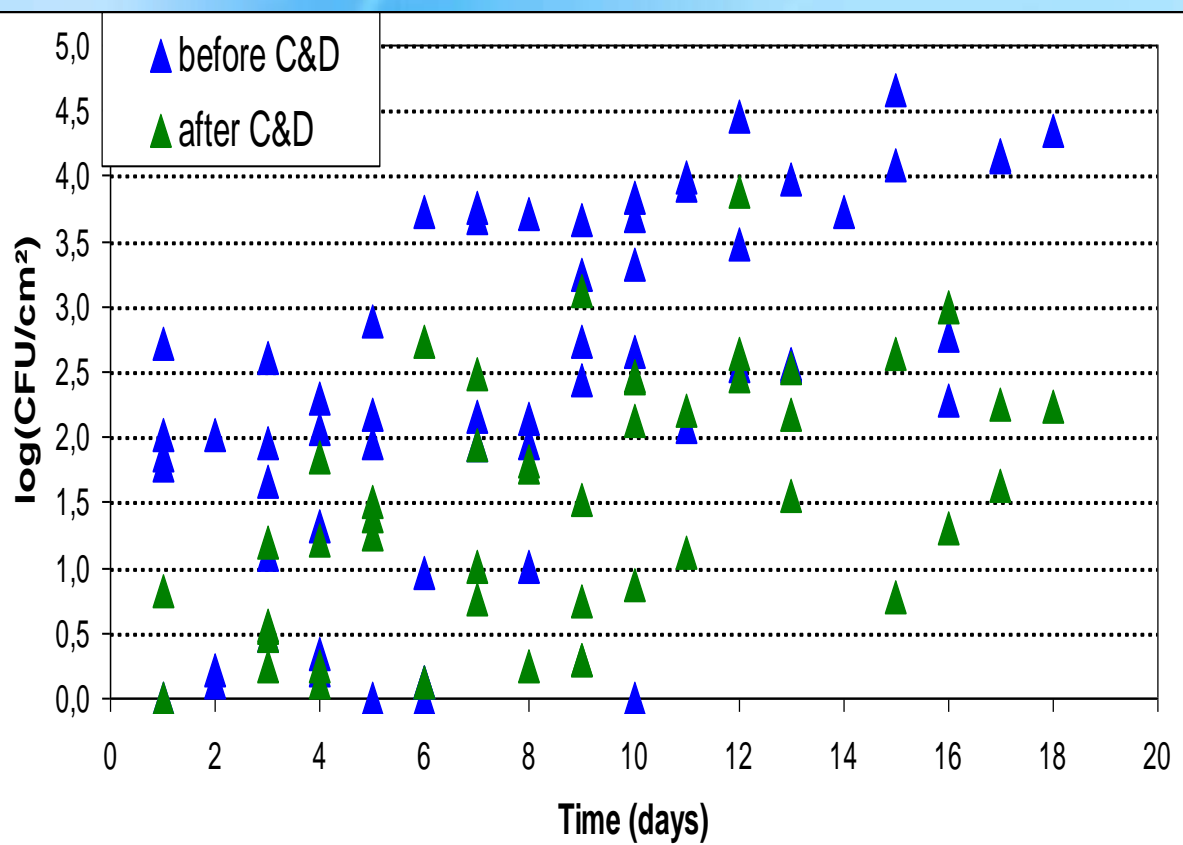
	Charge initiale log (ufc/mL)	Jours avant 1 ^{er} N&D	log (ufc/cm ²) avant 1 ^{er} N&D	Phase de croissance	<u>Persistance</u>
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	3	1	< 2	Exp.	Non

Plus petite charge bactérienne de l'exsudat de viande permettant d'obtenir la persistance sur des éprouvettes de $\cong 4 \text{ cm}^2$

	Charge initiale log (ufc/mL)	Jours avant 1 ^{er} N&D	log (ufc/cm ²) avant 1 ^{er} N&D	Phase de croissance	<u>Persistance</u>
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	3	1	< 2	Exp.	non
	5	1	2-3	Exp.	OUI

Pseudomonas fluorescens

Valeurs médianes



Diminution par jour : **1 log**
sauf le premier jour

Augmentation par jour :
1,37 log calculé après les
deux premiers jours

Latence en l'absence de choc
chimique: **1,5 jour**

Après les deux premiers jours :
plus de latence

Plus petite charge bactérienne de l'exsudat de viande permettant d'obtenir la persistance sur des éprouvettes de $\cong 4 \text{ cm}^2$

	Charge initiale log (ufc/mL)	Jours avant 1 ^{er} N&D	log (ufc/cm ²) avant 1 ^{er} N&D	Phase de croissance	<u>Persistance</u>
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	3	1	< 2	Exp.	non
	5	1	2-3	Exp.	OUI
<i>E. coli</i> O157:H7	8	1	5	Exp.	non

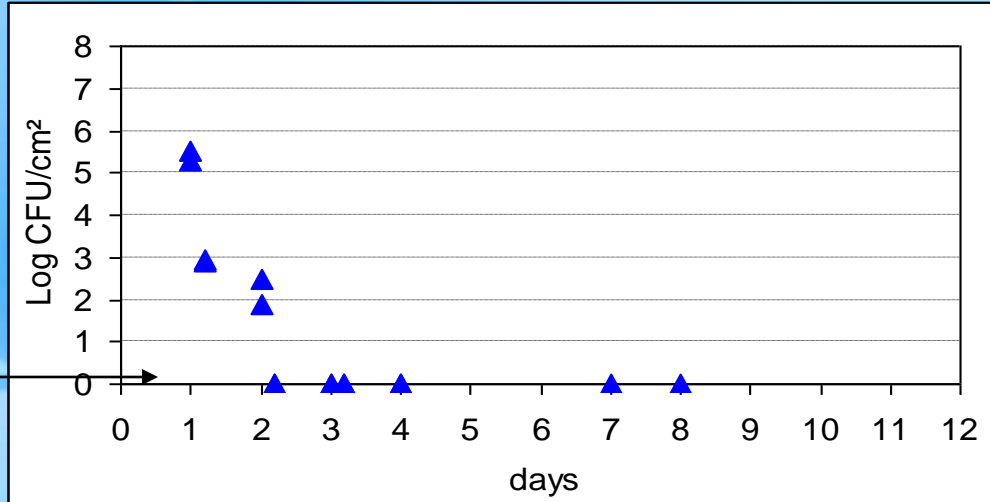
Plus petite charge bactérienne de l'exsudat de viande permettant d'obtenir la persistance sur des éprouvettes de $\cong 4 \text{ cm}^2$

	Charge initiale log (ufc/mL)	Jours avant 1 ^{er} N&D	log (ufc/cm ²) avant 1 ^{er} N&D	Phase de croissance	<u>Persistance</u>
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	3	1	< 2	Exp.	non
	5	1	2-3	Exp.	OUI
<i>E. coli</i> O157:H7	8	1	5	Exp.	non
	8	3	7	Stat.	OUI

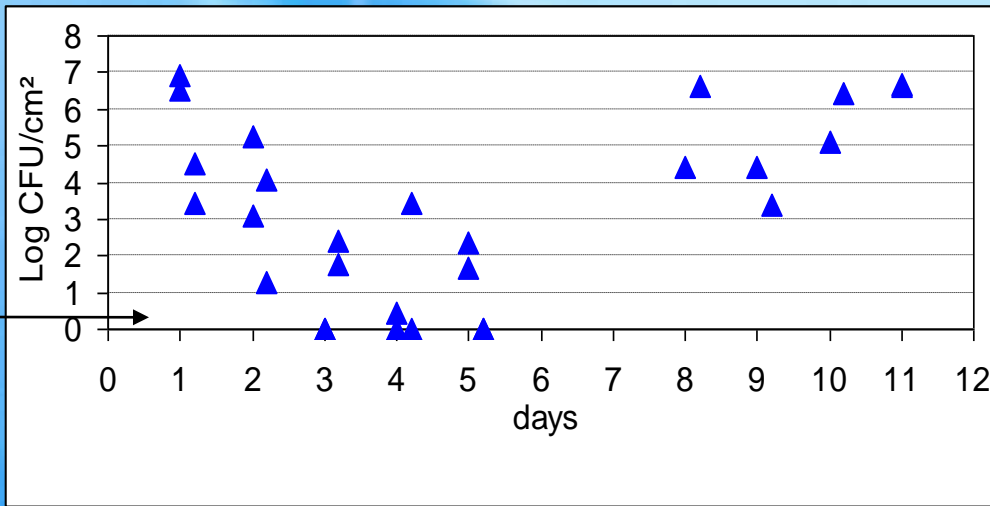




E. coli O157:H7



Biofilms de 1 jour
au début de
l'essai :
**Pas de
persistance**



Biofilms de 3
jours au début de
l'essai :
Persistance

Limite de
détection

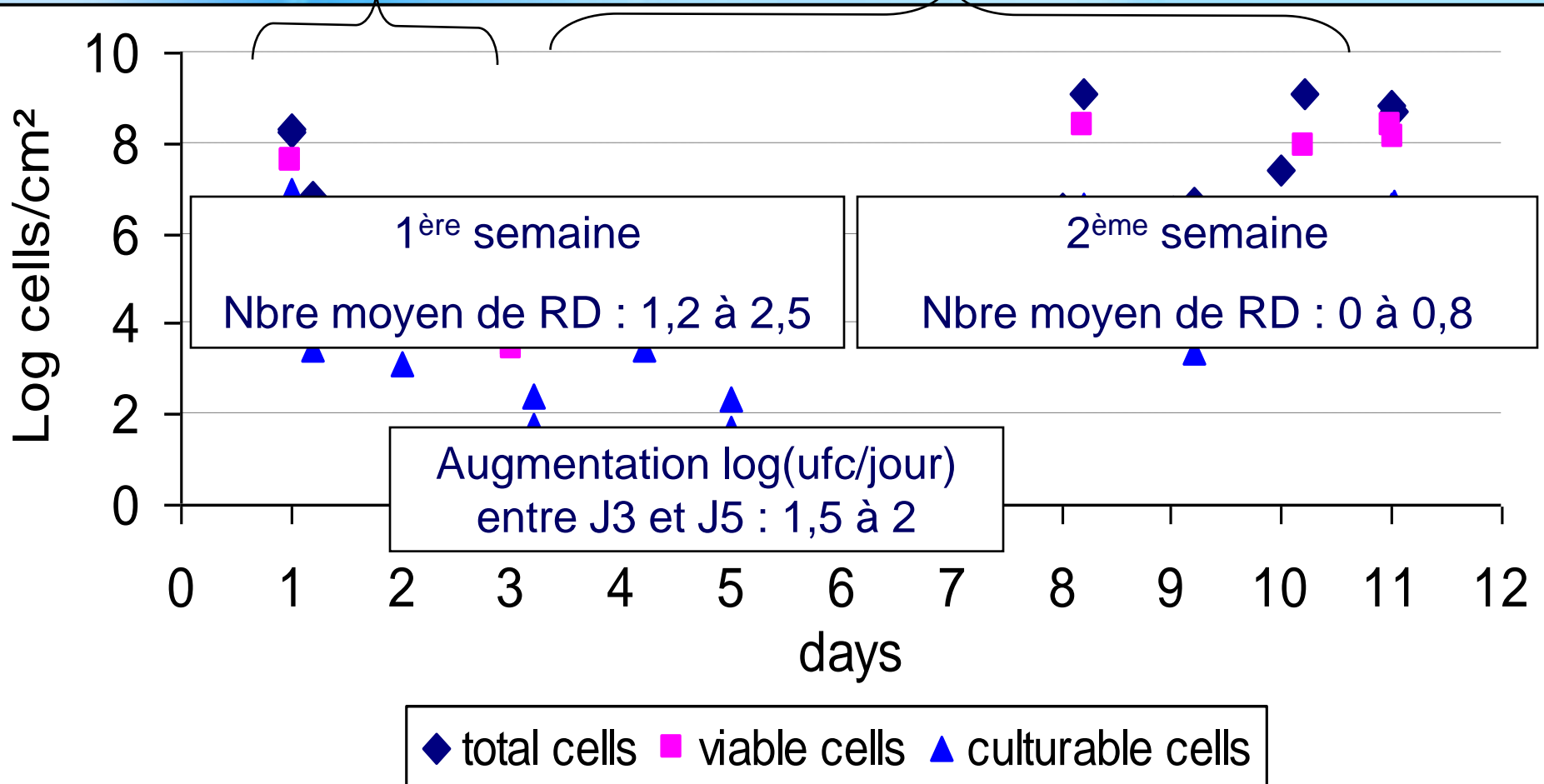




E. coli O157:H7

Pas de croissance

Croissance



Plus petite charge bactérienne de l'exsudat de viande permettant d'obtenir la persistance sur des éprouvettes de $\cong 4 \text{ cm}^2$

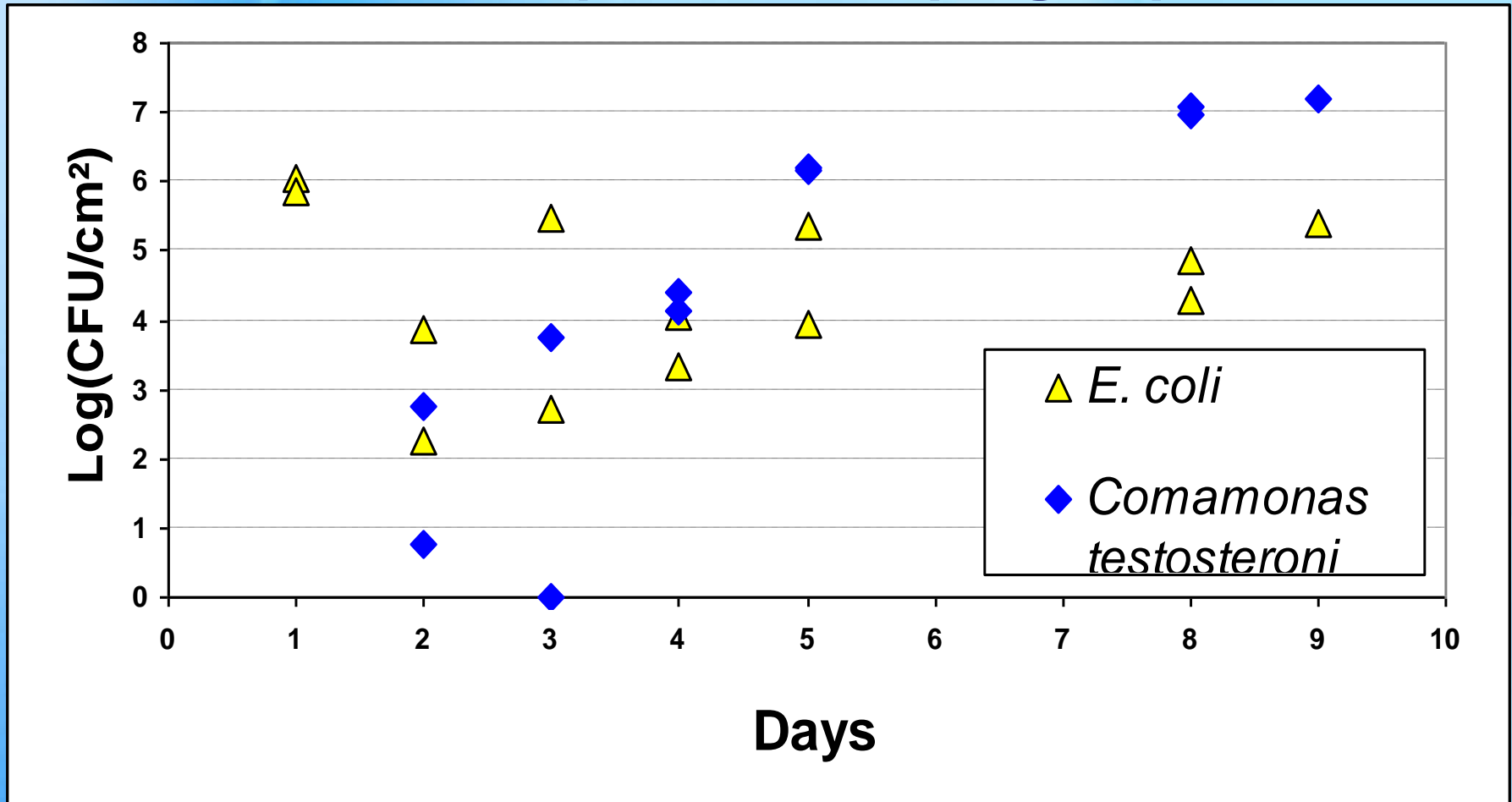
	Charge initiale log (ufc/mL)	Jours avant 1 ^{er} N&D	log (ufc/cm ²) avant 1 ^{er} N&D	Phase de croissance	<u>Persistance</u>
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	3	1	< 2	Exp.	non
	5	1	2-3	Exp.	OUI
	8	1	5	Exp.	non
<i>E. coli</i> O157:H7	8	3	7	Stat.	NON

Population du biofilm en fin de croissance
10⁷ ufc/cm²





Devenir de *E. coli* O157:H7 en biofilm bi-microbien soumis à N&D répétés : comptage après N&D



La vraie vie : surfaces neuves dans un meuble frigorifique de vente charcuterie

Feuille de PVC

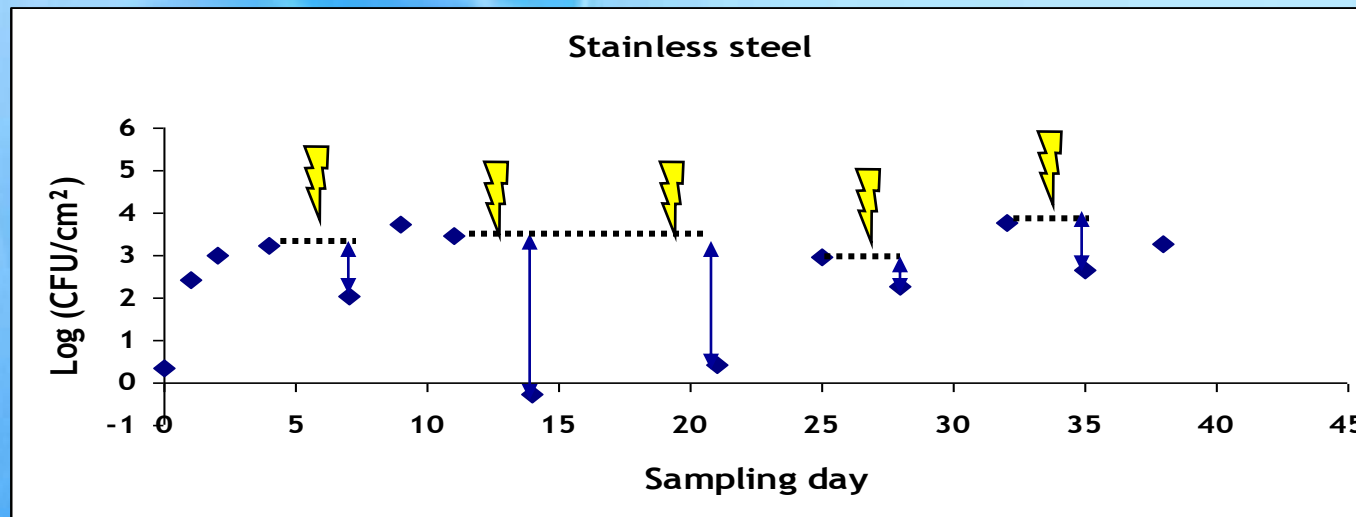
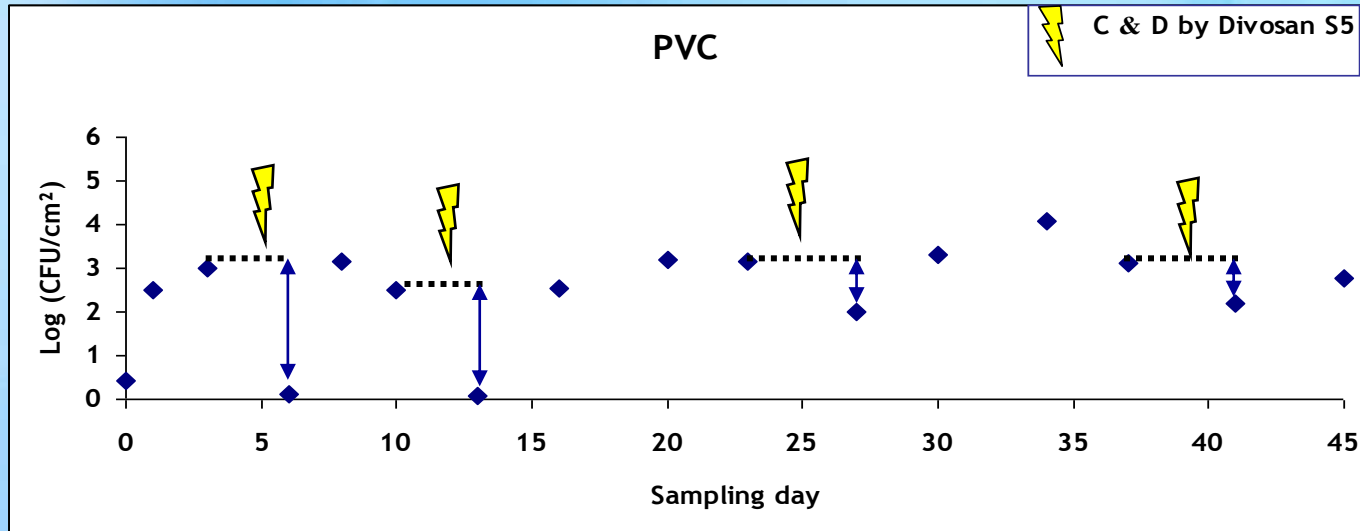
Inox

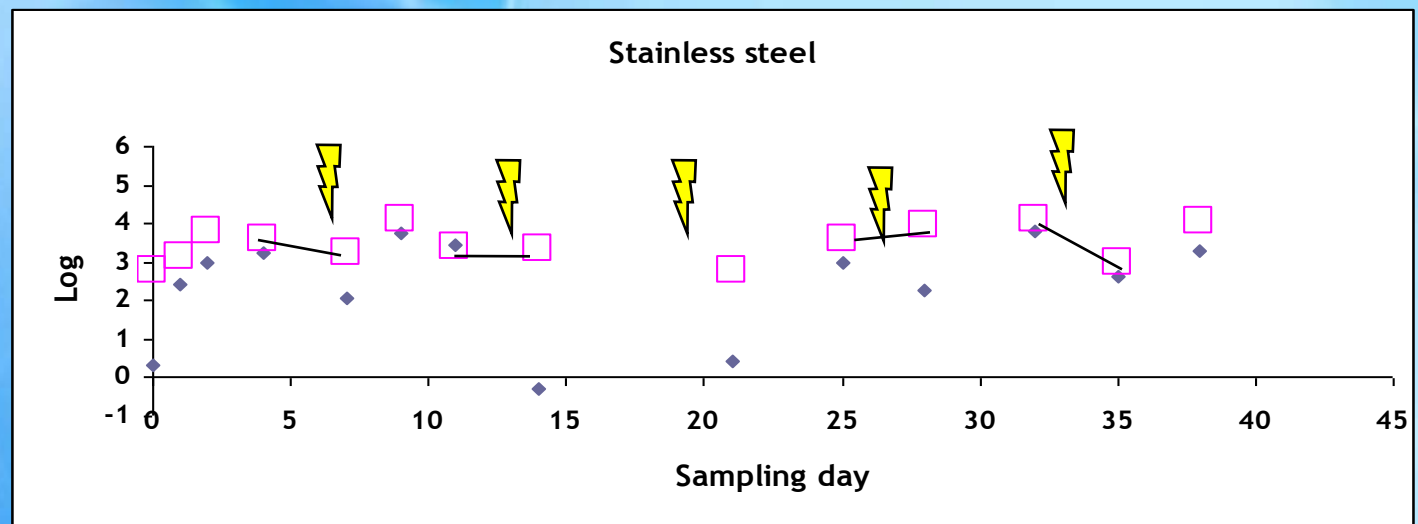
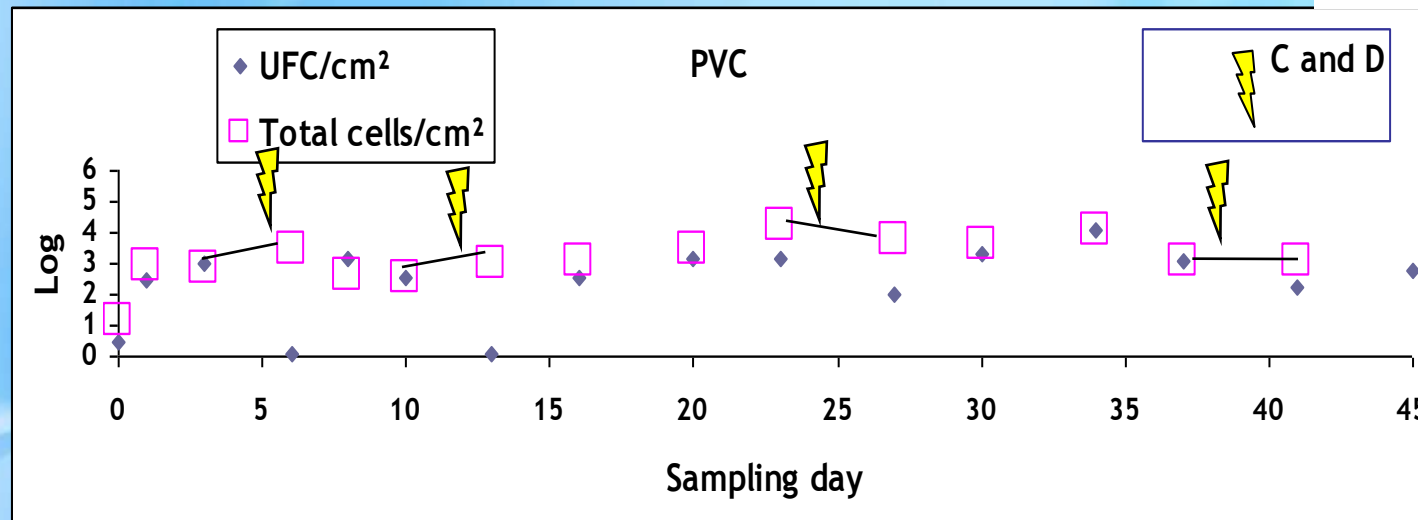


Surface échantillonnée : 320 cm²



Surface échantillonnée : 480 cm²





Listeria monocytogenes

Qu'est-ce qu'une souche persistante ?

- Isolement répété au même endroit (Borucki *et al.* 2003)
- Isolée 5 fois ou plus pendant plus de 3 mois (Lundén *et al.* 2003)
- Trouvée de façon récurrente pendant au moins 1 an, à la fois sur l'équipement et dans le produit fini (Autio *et al.* 2003)

11 ateliers (poisson, laiterie, viande, volaille)
Par pulsotypage : 17 persistantes , 38 transitoires
Combinaison de PFGE et AFLP : 48 génotypes

Génotype	Etat	Atelier viande et volaille
GT 11	2 transitoires	C, G
GT 4	2 transitoires	G, H
GT 26	3 persistantes	D, E, F
GT 31	1 transitoire	B
	1 persistante	H
GT22	1 transitoire	A
	1 persistante	H

Autres génotypes: une souche seulement par génotype

(Autio *et al.* 2003)



Pourquoi certains clones persistent dans les ateliers alimentaires ?

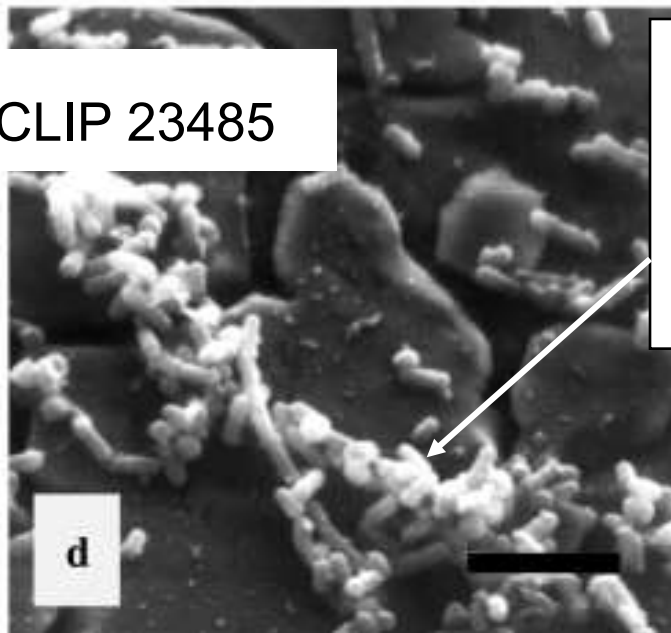
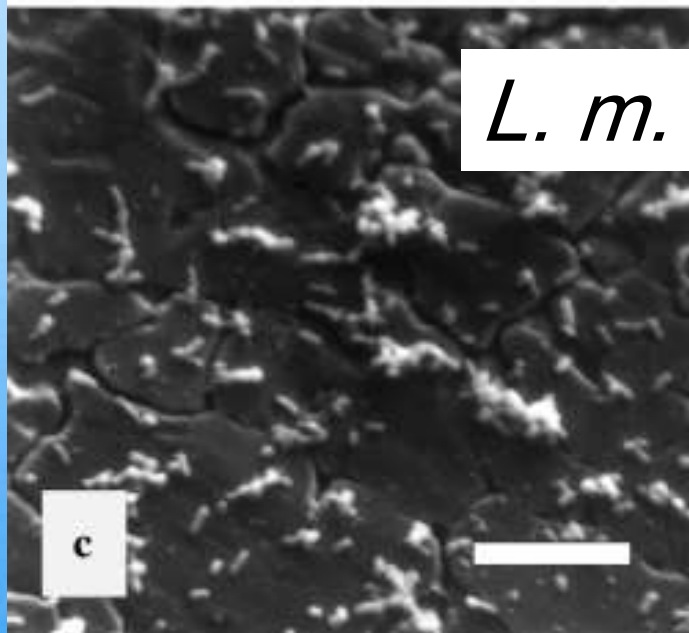
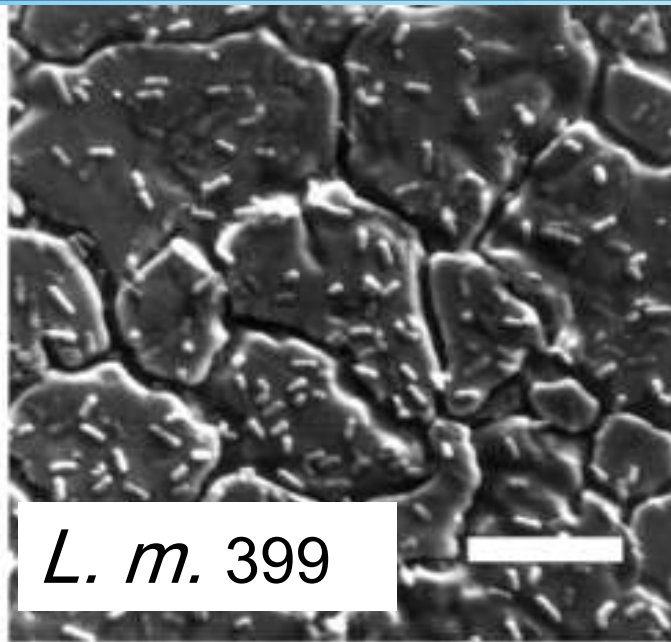
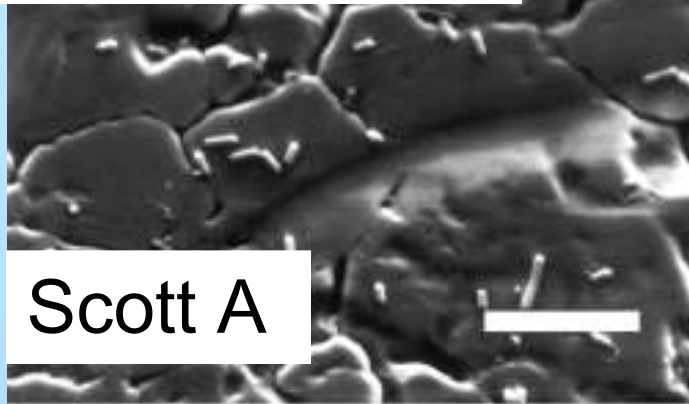
- Différence intrinsèque entre souches persistantes et transitoires ?
 - Adhésion ?
 - Formation de biofilm?
 - Sensibilité aux désinfectants ?

Adhésion accrue ou formation de biofilm?

De vieilles hypothèses et beaucoup de travaux publiés



Croissance de biofilms en BHI sur inox

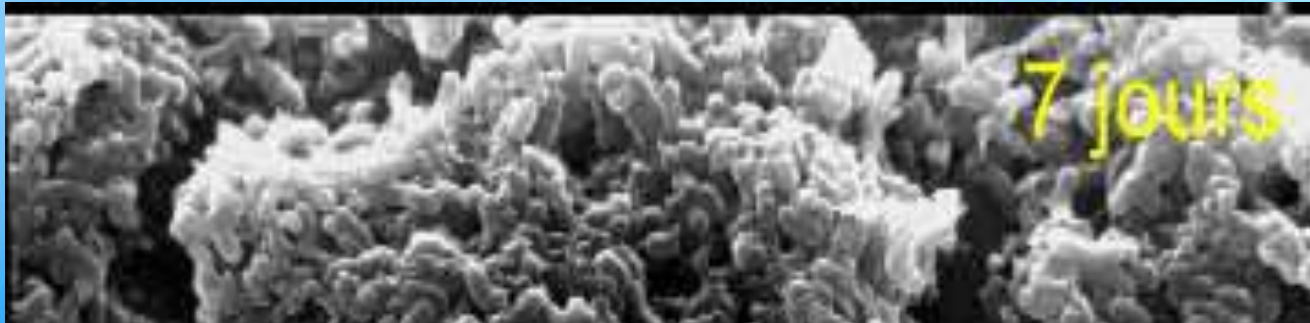


L. m. CLIP 23485

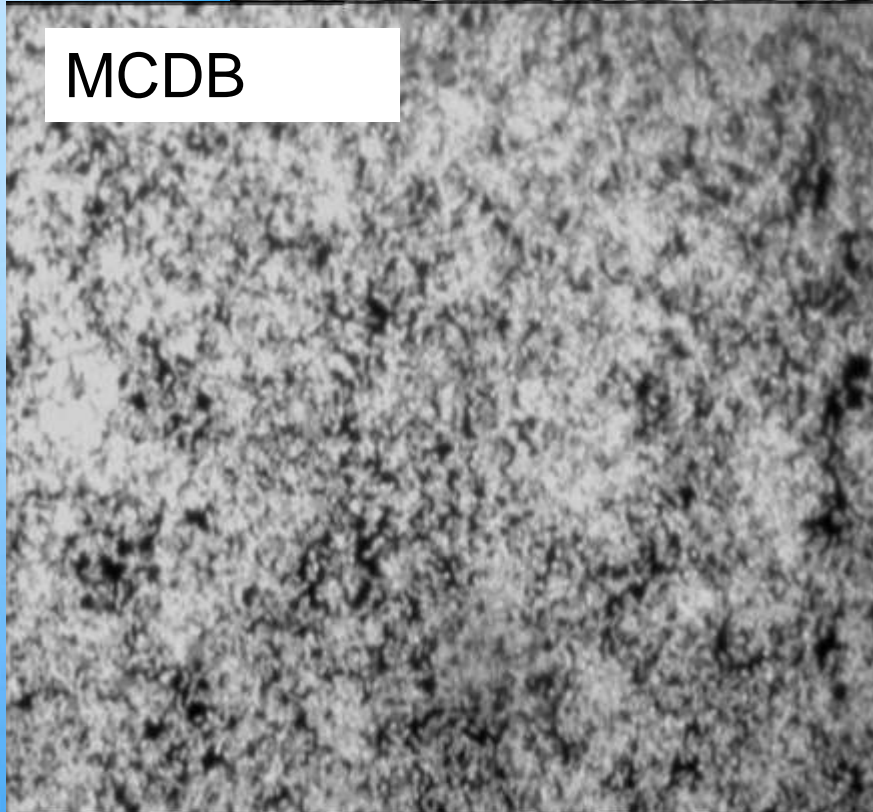
Une souche sur 36 formait des microcolonies



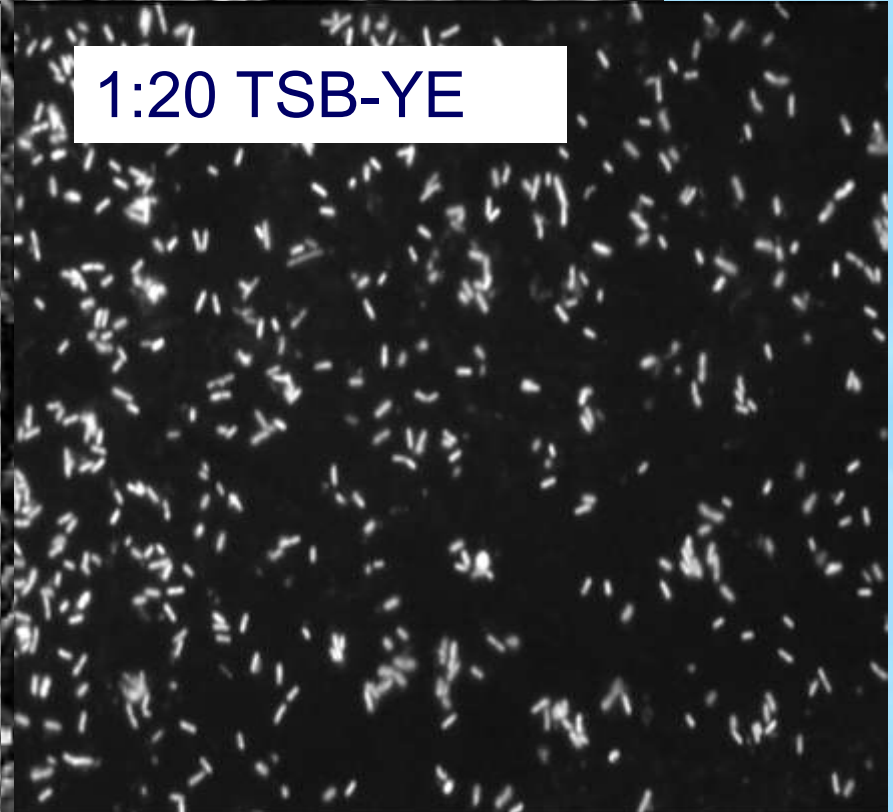
Biofilm cultivé sur bouillon chimiquement défini 202 (MCDB)



MCDB



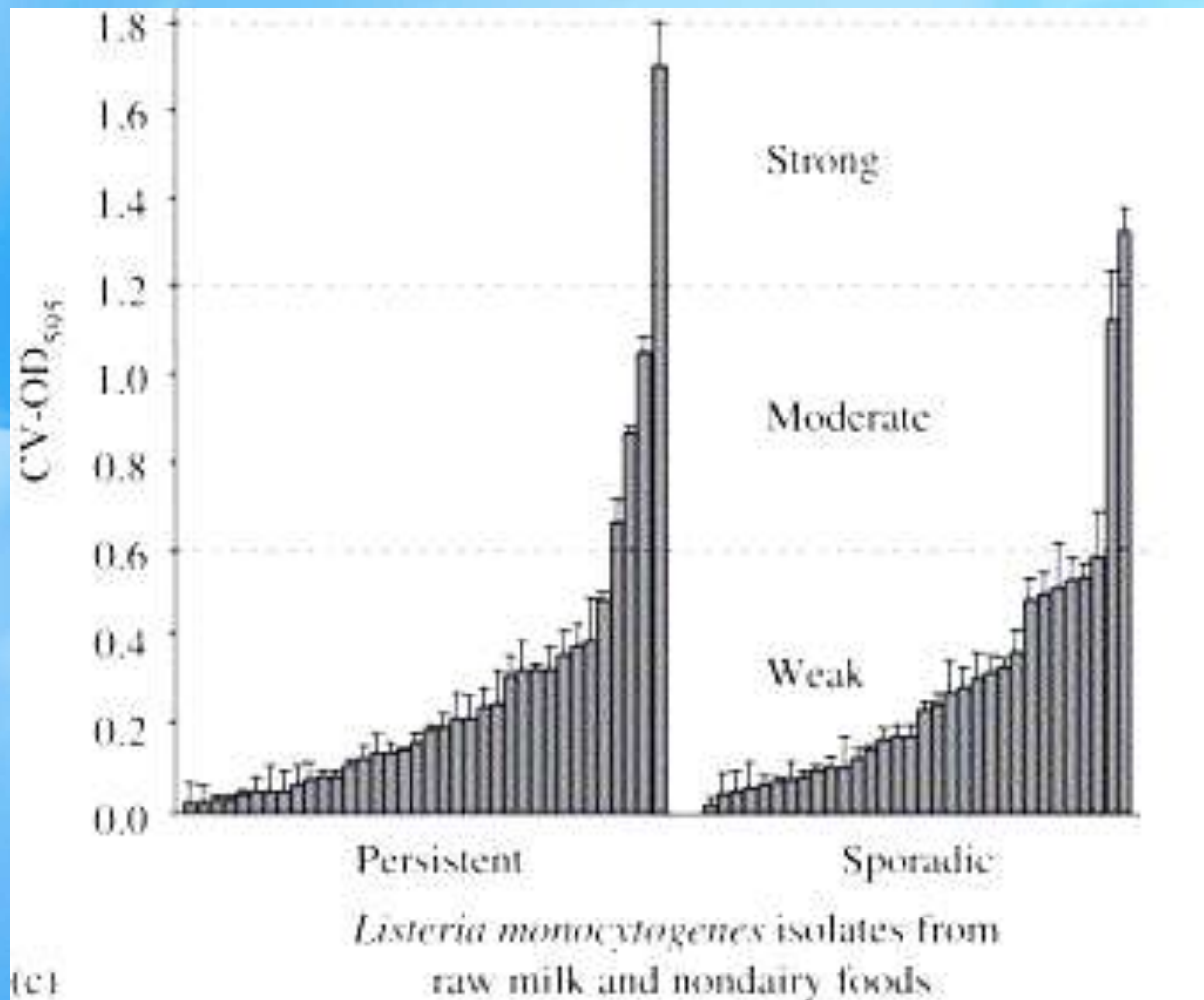
1:20 TSB-YE



Adhésion plus forte ou formation de biofilm par des souches persistantes ?

- **NS** -Djorjevik *et al.* (2001) 5 transitoires non significativement différentes de 5 persistantes
- **S** - Borucki *et al.* (2003): persistante > non-persistante ($P=0.03$) (15 non-persistantes, 11 persistantes)
- **NS** – production de biofilm similaire par les souches transitoires et persistantes (Harvey *et al.* 2007)
- **NS** - Asséré *et al.* (non publié): les 3 persistantes testées avaient une population de biofilm élevée mais quelques souches transitoires aussi (3 milieux de culture testés)

Formation de biofilm évaluée avec du violet cristal



Harvey *et al.* (2007)

Sensibilité aux désinfectants

- Pas de différence significative entre souches persistantes et transitoires
 - Par la méthode en suspension (Earnshaw et Lawrence, 1998 ; *Holah et al.*, 2002; Megaw and Lawrence, 1995)
 - Par une méthode sur porte-germes
 - Cellules séchées sur une surface (**Kastbjerg and Gram, communication personnelle**)
 - Biofilms de 1 à 10 jours (**Asséré et al., résultats non publiés**)

Adaptation au désinfectant?

Comparaison de 2 souches persistantes avec 2 souches transitoires en culture pure planctonique (Lundén *et al.* 2003) :

- Résistance initiale : CMI des souches transitoires < CMI des souches persistantes (de 1,3 à 4 fois supérieure)
- Une augmentation progressive de la concentration entraîne une adaptation, toutes les souches atteignent la même CMI

Pourquoi certains clones persistent dans des ateliers alimentaires ?

- Différence intrinsèque entre souches persistantes et transitoires ?
 - Adhésion ?
 - Formation de biofilm ?
 - Sensibilité aux désinfectants ?

NON

Facteurs associés à la contamination des surfaces par *L. monocytogenes* dans les ateliers volaille ou porc (Chasseignaux *et al.* 2002).

Souillure organique

pH neutre à alcalin

HR élevée (> 70%)

T basse (< 10 C)

Incidence de *L.m.* dans les zones en aval du traitement thermique de 41 ateliers de viande examinés aux États-Unis pendant l'année 1987 (revu by Gravani, 1999)

<u>Zone</u>	<u>Échantillons positifs(%)</u>
Sols	37%
Caniveaux	37%
Ustensiles de nettoyage	24%
Zones de nettoyage	24%
Surfaces en contact avec les aliments	20%
Condensats	7%
Murs et plafonds	5%
Air comprimé	4%

Facteurs associés à la contamination des surfaces par *L. monocytogenes* dans les ateliers volaille ou porc (Chasseignaux *et al.* 2002).

Impact sur

l'adhésion
aux
surfaces

Souillure organique

+/-

pH neutre à alcalin

-

HR élevée (> 70%)

-

T basse (< 10 C)

-

•Le lait écrémé et les protéines du lait réduisent l'adhésion à l'inox (Barnes *et al.* 1999; Helke *et al.* 1993)

•Optimum à pH bas (Smoot and Pierson, 1998; Duffy and Sheridan, 1997)

•Optimum à 18°C, comparé à 4 et 30°C (Norwood and Gilmour, 2001)



Facteurs associés à la contamination des surfaces par *L. monocytogenes* dans les ateliers volaille ou porc (Chasseignaux *et al.* 2002).

Impact sur

l'adhésion
aux
surfaces

la
croissance

Souillure organique

+/-

+

pH neutre à alcalin

-

+

HR élevée (> 70%)

-

+

T basse (< 10 C)

-

+

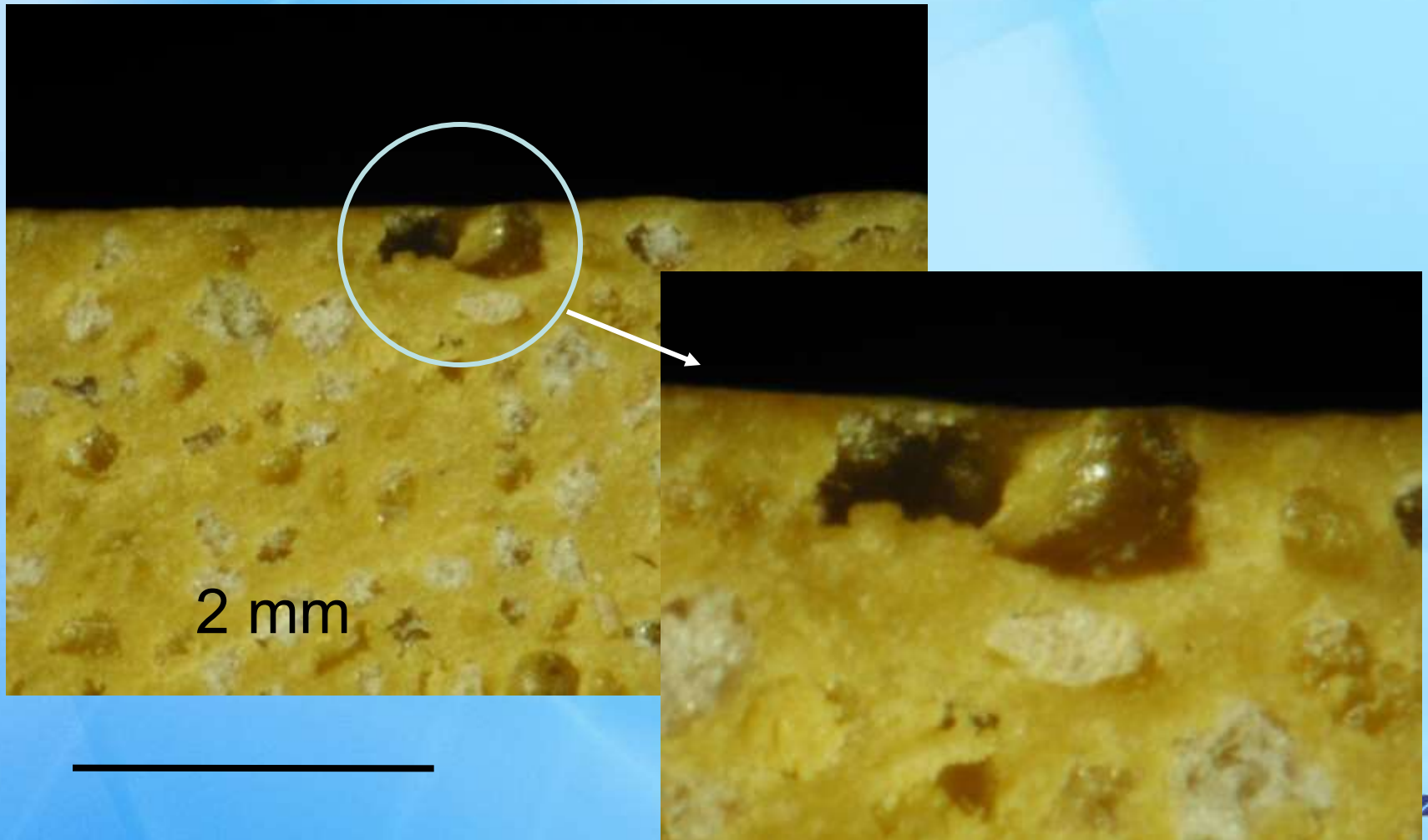
= Favorise la croissance de *L. m.* en culture mixte avec des espèces non psychrotrophes



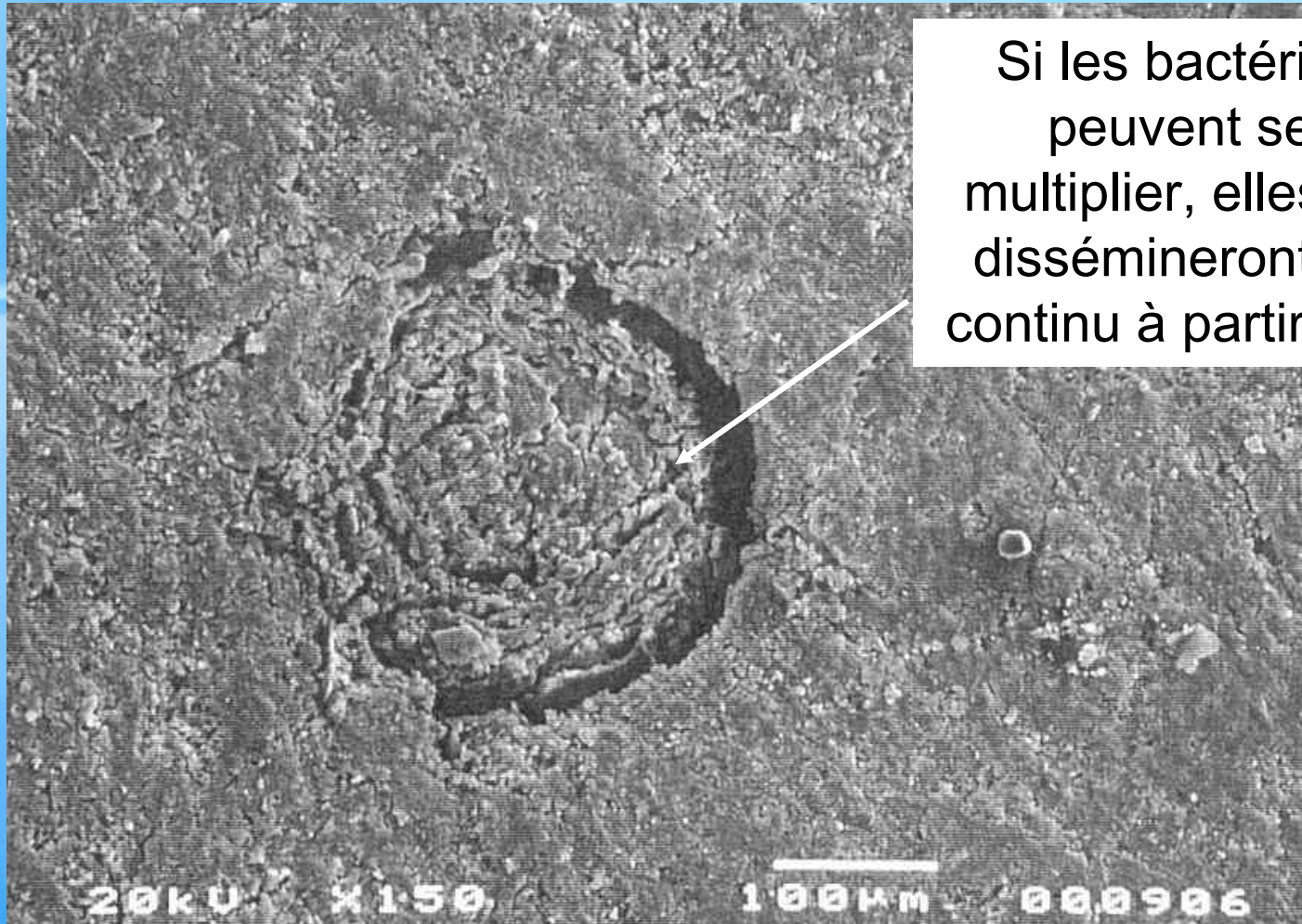
afssa

Les surfaces inégales en résine ou en plastique sont plus fréquemment contaminées que les surfaces lisses en inox (Chasseignaux *et al.* 2002).

Coupe d'un sol à base de polyuréthane

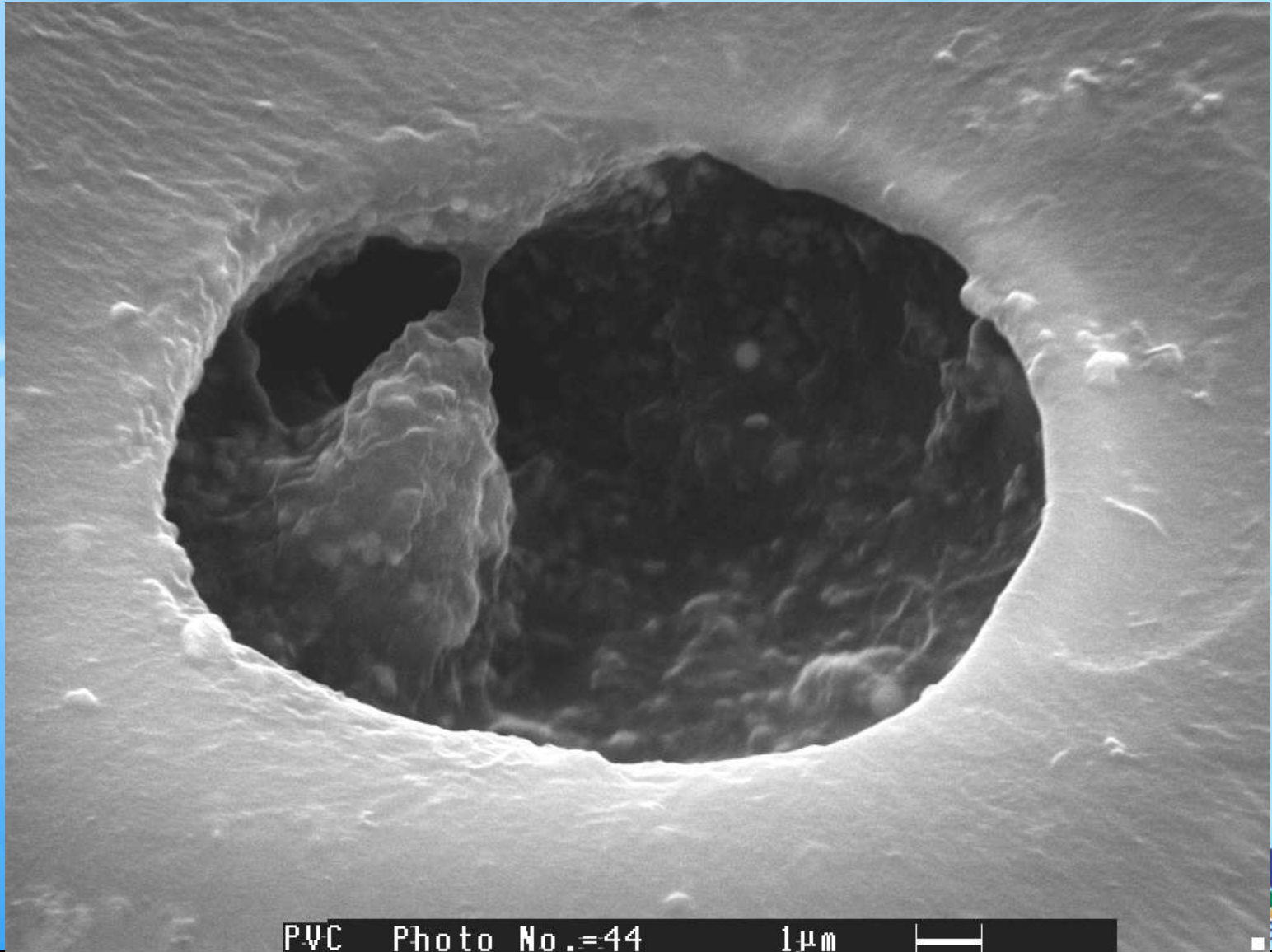


Sol à base de polyuréthane après 8 semaines dans un atelier de viande, après N&D



Si les bactéries peuvent se multiplier, elles se dissémineront en continu à partir d'ici

PVC de tapis convoyeur



Conclusion 1 : *Listeria monocytogenes*

- Les différences entre souches persistantes et non-persistantes ne sont pas claires
- **Le potentiel de croissance à basse température et l'existence de zones de rétention sont probablement les meilleures explications de la persistance**

Conclusion 2 : explications possibles de la présence de souches persistantes après N&D

- **Entrée accidentelle**

- « Accidentelle »

- En raison d'une charge « élevée », notion dépendant de l'espèce bactérienne (« basse » pour *P. fluorescens*, « élevée » pour *E. coli* O157:H7)

- Et/ou parce que les bactéries atteignent une zone de rétention

- Un N&D ne suffit pas à « éliminer » les bactéries

- Puis deux possibilités:

- Les bactéries sont incapables de se multiplier et seront éliminées après les N&D suivants ⇒ survie transitoire
- Les bactéries peuvent se multiplier ⇒ persistance

- **Entrée permanente** d'une souche avec une matière première ou un ingrédient et non éliminée par N&D



Conclusion 3 : pour les exploitants

- L'installation d'une microflore persistante est inévitable
- Que faire ?
 - Limiter l'entrée des micro-organismes indésirables par la maîtrise des matières premières et de **l'eau** (*Pseudomonas*), etc.
 - Surveiller convenablement l'environnement
 - Ralentir la croissance : **T°**, nutriments, **séchage**
 - Améliorer l'élimination de la contamination : conception hygiénique, augmentation de la fréquence des **N&D**, au moins de façon provisoire pour résoudre une crise *L. m*
 - Quand une souche de *L. m.* ne peut être éliminée (**probablement la règle !**), contrôler les zones de rétention

Merci de votre attention

Remerciements :

ANR projet « SIMPFRI » EU projet « PathogenCombat »

<http://simpfri.cemagref.fr/>

<http://www.pathogencombat.com/>



Nesrine Marouani-Gadri



Eric Mettler



Emmanuelle Legendijk



Olivier Firmesse



Sophie Peneau



Adrien Asséré



Danielle Chassaing



Graziella Midelet



Anne-Marie Leconte

« PathogenCombat »: Lone Gram, Vicky Kasberg, Joanna Verran, Katherin Whitehead, Adele Parker, Claire Mariani

« SIMPFRI »: Elisabeth Morelli, Véronique Noël, Philippe Rosset, Thierry Benezech