

# Bilan de la caractérisation des souches isolées dans le cadre du plan de surveillance 2006 - Contamination par *Listeria monocytogenes* des préparations de viandes

## CONTEXTE

L'objectif de ce travail était de réaliser la caractérisation phénotypique et génotypique des souches de *Listeria monocytogenes* isolées dans le cadre d'un plan de surveillance piloté par la DGAL en 2006. Ce plan de surveillance avait été mis en place pour estimer la prévalence et le niveau des contaminations par *L. monocytogenes* de certaines préparations de viande et produits assimilés, au stade de la fabrication des produits, dans les établissements agréés. Les prélèvements de préparations de viande ont été réalisés au niveau national, dans 24 départements tirés au sort, comportant des établissements agréés pour la fabrication de ces produits. Les produits à prélever étaient des préparations de viande de type saucisse (chipolatas, merguez, saucisses de volailles...) ou de type chair à saucisses.

## MÉTHODES

Les souches de *L. monocytogenes*: Les laboratoires d'analyses alimentaires de 22 départements (Figure 1) ont fait parvenir au total 156 isolats de *L. monocytogenes*. Les souches ont été caractérisées d'une part par sérotypage et d'autre part, par électrophorèse en champ pulsé ou PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis). L'ensemble des analyses a été réalisé sous assurance qualité.

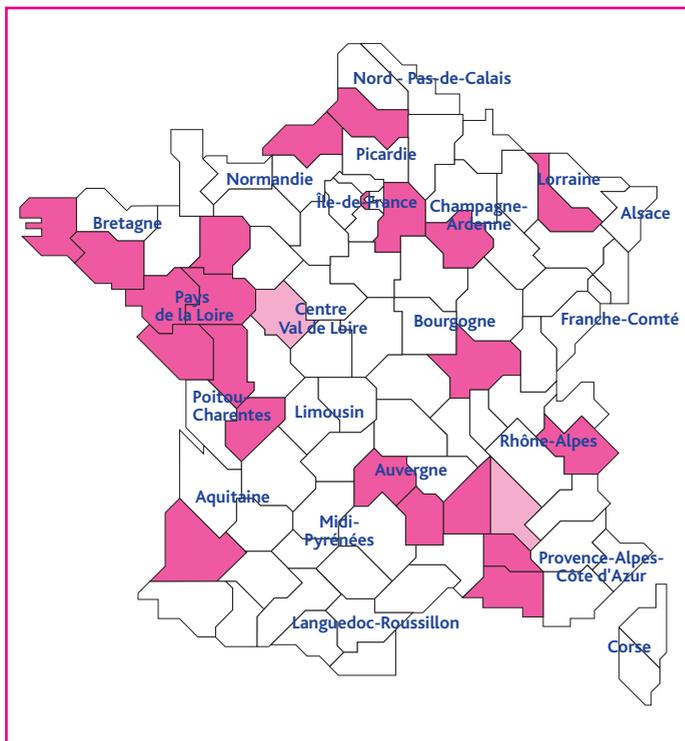


Figure 1 : Départements participant (en rose) au plan de surveillance 2006 (ceux présentés en rose foncé ont transmis des souches de *L. monocytogenes* au Laboratoire d'études et de recherches sur la qualité des aliments et sur les procédés agroalimentaires de l'Afssa).

Le sérotypage a été réalisé soit de manière classique, par agglutination, selon une méthode interne accréditée COFRAC avec des sérums fabriqués au Japon (Deiken) commercialisés par la société Eurobio (Les Ulis, France), soit par sérotypage moléculaire en

utilisant une méthode de PCR multiplex adaptée de celle publiée en 2004 par Doumith et collaborateurs [1]. Par souci de simplification, les résultats sont exprimés avec les noms de sérovars tels qu'ils sont décrits classiquement.

Le PFGE consiste à extraire de l'ADN total et à le digérer par l'enzyme *Apal* d'une part et par l'enzyme *Ascl* d'autre part, suivant un protocole standardisé et développé spécifiquement pour ce pathogène (Graves and Swaminathan, 2005 (2); protocole accessible sur le site du CDC: [http://www.cdc.gov/pulsenet/protocols/pulsenet\\_listeria\\_protocol%20.pdf](http://www.cdc.gov/pulsenet/protocols/pulsenet_listeria_protocol%20.pdf)).

Après migration électrophorétique de l'ADN restreint, les fragments d'ADN sont révélés au bromure d'éthidium. L'analyse des profils génomiques est réalisée à l'aide du logiciel BioNumerics et la comparaison des profils se fait par la construction d'un dendrogramme obtenu après comparaison des coefficients de Dice, de chaque profil différent, avec la méthode UPGMA. À chaque profil différent est attribué un numéro selon une nomenclature propre au laboratoire.

## RÉSULTATS

Les 156 souches de *L. monocytogenes* se sont réparties en 5 sérogroupes (Figure 2). Les deux sérovars majoritaires étaient le sérovar 1/2c (63 souches) et le sérovar 1/2a (62 souches). Par ailleurs, 17 souches 1/2b, 13 souches 4b et une souche 4e ont été identifiées. Le sérovar 1/2c a été plus fréquemment observé (40 %) par rapport aux souches habituellement analysées au laboratoire. En effet, parmi les 3000 souches de toutes origines alimentaires et environnementales caractérisées depuis 2001 au laboratoire, nous avons enregistré environ 65 % de souches de sérovar 1/2a et 10 % de souches de sérovar 1/2c.

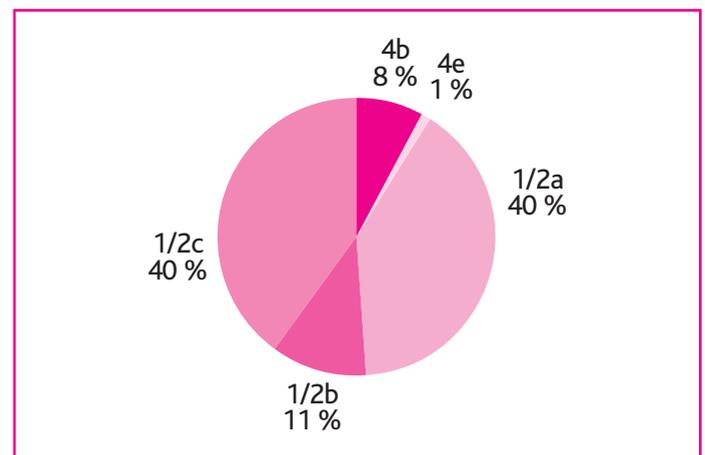
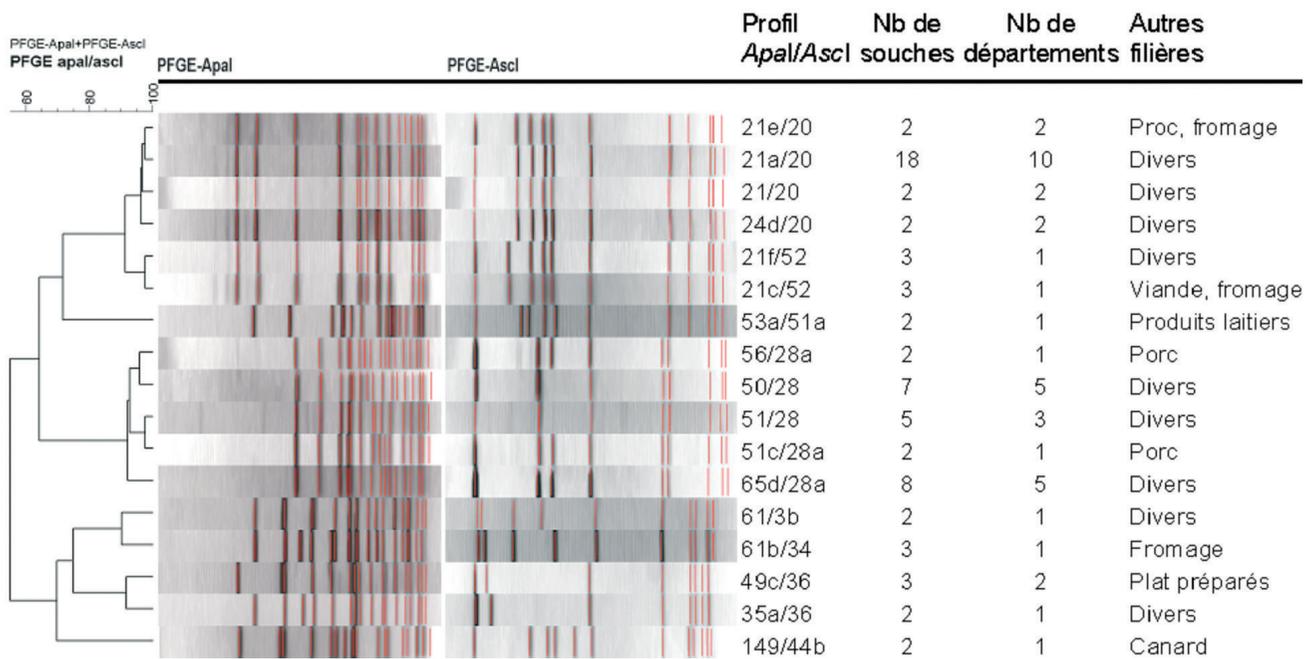


Figure 2 : Répartition des 156 souches de *L. monocytogenes* par sérovar.

Lorsque plusieurs souches d'un même échantillon ont été reçues, un dédoublement a été réalisé de façon à n'étudier qu'une seule souche par PFGE quand toutes les souches d'un même échantillon présentent le même sérovar. Au préalable, il avait été vérifié que toutes les souches provenant d'un même échantillon et de même sérovar présentaient systématiquement un seul et même profil PFGE avec les deux enzymes *Apal* et *Ascl*. Dans le cas où deux



**Figure 3 :** Profils PFGE combinés Apal/Ascl les plus fréquemment identifiés suite à l'étude des souches isolées dans le cadre du plan de surveillance ; tous ces profils étaient déjà présents dans la base de données initiale des profils PFGE de l'Afssa - Laboratoire d'études et de recherches sur la qualité des aliments et sur les procédés agroalimentaires.

sérovars différents étaient observés dans un même échantillon, une souche représentative de chaque sérovar a été étudiée par PFGE. Par ailleurs, certains laboratoires nous ont fait parvenir des souches suite au dénombrement réalisé sur un échantillon et suite à la recherche de *L. monocytogenes* sur ce même échantillon. Dans ce cas les souches issues de l'isolement et du dénombrement ont été étudiées par PFGE. Au total, 135 souches ont été caractérisées par PFGE.

Les souches étudiées par PFGE se sont réparties en 52 profils Apal et 44 profils Ascl. La combinaison des résultats obtenus avec les deux enzymes de restrictions permet de différencier les 135 souches en 65 profils distincts, dont 38 ne sont observés qu'une seule fois (58,5 %). Parmi les 27 profils observés pour au moins 2 souches, 13 d'entre eux étaient communs à des souches isolées de différents départements. Le profil le plus fréquent : 21a/20, relié à des souches de sérovar 1/2c, généralement moins polymorphes, a été mis en évidence pour 18 souches isolées de prélèvements réalisés dans 10 départements différents (figure 3). La comparaison des souches isolées lors du dénombrement avec celles isolées lors de la recherche de *L. monocytogenes* dans un même prélèvement, a montré la présence des mêmes profils PFGE dans 4 cas sur 5. Il est à noter également que les profils les plus fréquemment observés sont associés à des souches isolées dans des produits variés (saucisses, merguez, farces, chipolatas...).

La base de données de profils PFGE du laboratoire est représentée par plus de 2 700 souches, correspondant à plus de 350 profils-types en Apal et 300 profils-types en Ascl. La comparaison des profils du plan de surveillance avec l'ensemble des profils de cette base du laboratoire a montré l'existence de nombreux profils déjà mis en évidence lors de précédentes études ou lors du typage de surveillance réalisés au Laboratoire d'études et de recherches sur la qualité des aliments et sur les procédés agroalimentaires. Les profils déjà identifiés correspondaient à des souches d'origine variable : souches isolées de plats préparés, ou isolées de différentes filières (lait et fromage, saumon fumé, porc). À l'inverse, d'autres profils ont été nouvellement identifiés à la suite de ce plan de surveillance.

## CONCLUSION

Les 156 souches de *L. monocytogenes* isolées à partir de préparations de viande dans le cadre de ce plan de surveillance ont présenté une diversité génétique importante. Elles se sont réparties en 5 sérovars correspondant à ceux généralement associés aux souches alimentaires. La proportion de souches de sérovar 1/2c a été cependant plus importante que pour l'ensemble des souches déjà reçues dans l'unité CEB du LERQAP (40 % dans cette étude contre 10 %). Les souches de sérovar 1/2a sont à l'inverse, moins nombreuses qu'habituellement (40 % contre 65 %). La caractérisation PFGE a porté sur 135 souches. Elle a permis de différencier les souches en 65 profils combinés Apal/Ascl. Quelques rares profils se sont montrés plus particulièrement spécifiques de souches isolées dans un département alors que d'autres étaient mis en évidence pour des souches isolées dans différents départements. Les profils les plus représentés ont été observés pour des souches d'origines diverses et aucun profil n'a pu être spécifiquement associé à un type précis de préparation de viande.

## RÉFÉRENCES

- [1] Doumith, M., Buchrieser, C., Glaser, P., Jacquet, C., Martin, P. (2004) Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *J Clin Microbiol*, 42(8): p. 3819-22.
- (2) Graves, L.M. and B. Swaminathan. 2005. PulseNet's Step-by-Step laboratory protocol for Molecular Subtyping of listeria monocytogenes by macrorestriction and Pulsed-field Electrophoresis. *Methods in Biotechnology*. Vol 21 : Food-Borne Pathogens: Methods and Protocols. pp 57-70. Ed: C.C. Adley, Humana Press Inc, Totowa, NJ.