

PREVALENCE DE LISTERIA MONOCYTOGENES DANS LES ABATTOIRS AVICOLES DE LA REGION D'ALGER ET CARACTERISATION MOLECULAIRE DES SOUCHES ISOLEES.

Bouayad Leila ¹, Hamdi Taha-Mossadak¹, Naïm malek²

¹Laboratoire HASAQ ENSV. BP 161, Hassan Badi, El Harrach, Alger.

² Laboratoire de microbiologie, HCA, Ain Naadja, Alger.

l.bouayad@ensv.dz

RÉSUMÉ :

Cette étude a été réalisée pour l'appréciation de l'évolution de la contamination par *Listeria monocytogenes* dans les carcasses de poulet le long de la chaîne d'abattage ainsi que la caractérisation génotypique des souches isolées.

212 échantillons ont été récoltés dans trois abattoirs avicoles (A, B et C) au niveau de deux sites de la chaîne d'abattage ; à l'étape éviscération (50%) et à la fin du processus d'abattage après emballage et réfrigération de 24h (50%).

La recherche de *Listeria* a été réalisée par la méthode ISO 11290-1. La caractérisation génotypique a été effectuée sur 26 isolats par l'utilisation de deux enzymes de restriction *AscI* et *ApaI* recommandées par la méthode Pulse Field Gel Electrophoresis (PFGE).

8.9% (19/212) du total des échantillons sont positifs à *Listeria monocytogenes*. Dans les abattoirs A et B, *Listeria monocytogenes* n'a été isolée qu'à la fin du processus d'abattage à des prévalences respectives de 23% (6/26) et 10% (4/40). Dans l'abattoir C, *Listeria monocytogenes* a été isolée à l'étape éviscération à une prévalence de 2,5% (1/40) et à la fin du processus d'abattage à une prévalence de 20% (8/40). La caractérisation génotypique a été réalisée pour identifier les degrés de similarité entre les isolats. La combinaison des résultats de restriction des deux enzymes a révélé 7 clusters de profils génétiques avec un niveau de similarité de 58%.

La contamination par *Listeria* survient et augmente le long de la chaîne d'abattage, favorisée par les nombreuses manipulations qui suivent l'opération d'éviscération jusqu'à obtention d'un produit fini. La caractérisation par la PFGE a permis de donner une empreinte génétique à chaque isolat.

ABSTRACT:

Prevalence of *Listeria monocytogenes* at poultry abattoirs and molecular characterization of isolates

This study was performed to assess the evolution of the *Listeria monocytogenes* contamination in chicken carcasses across the slaughter lane and genotypic characterization of the isolates. A total of 212 samples were collected in three poultry abattoirs (A, B and C) at two sites on the processing lines; at the evisceration stage (50%) and at the end of processing after packaging and refrigeration at 4°C for 24 h (50%).

Listeria screening was performed according to the ISO 11290-1 method.

Twenty six *Listeria monocytogenes* isolates were characterized by DNA macrorestriction using Pulse field gel electrophoresis method according to the PulseNet standardized protocol.

8.9% (19/212) of the 212 tested samples were positive for *L. monocytogenes*. At abattoirs A and B, *L. monocytogenes* was isolated only at the end of the slaughter process and prevalences were 23% (6/26) and 10% (4/40) respectively. At the abattoir C, *L. monocytogenes* was isolated at both evisceration stage with a prevalence of 2.5% (1/40) and at the end of the slaughter process with a prevalence of 20% (8/40).

Genotypic characterization was performed to determine the genetic relatedness among isolates.

The combination of the typing data from the two enzymes revealed seven clusters with a similarity level of 58%. The *Listeria* contamination of carcasses at abattoirs likely occurs and increases during processing after the evisceration stage. The molecular characterization provided a genetic fingerprint of all of the isolates of *L. monocytogenes*.

INTRODUCTION :

Listeria monocytogenes, est un germe pathogène transmis par voie alimentaire, ubiquitaire et résistant, il représente un grand problème en médecine humaine non à cause du nombre de malades qui sont signalés chaque année, mais surtout à cause des taux de mortalité de l'ordre de 25 à 30 % qui sont enregistrés (Farber et Peterkin, 1991). Ce germe pose aussi un problème majeur pour les industriels agro-alimentaires chez qui les rappels massifs des produits contaminés par ce pathogène causent des pertes économiques considérables.

Suite aux quatre grandes épidémies de listériose qu'ont vécu les Etats unis d'Amérique en 1988, où la consommation de produits prêts à consommer (PAM) à base de viandes de volailles a été incriminée (Ryser, 2007), l'intérêt porté à ce germe s'est généralisé à cette catégorie d'aliment et la présence des *Listeria* dans les viandes de volailles est largement documentée dans de nombreux pays.

En Algérie, une étude antérieure a permis d'isoler *L. monocytogenes* dans les PAM à base de viande de volaille (Bouayad et Hamdi, 2011), mais il n'existe aucune information relative à sa présence et son comportement dans les carcasses de volailles au niveau des abattoirs. Carcasses qui constituent la matière première pour fabriquer ces produits PAM. Les objectifs de cette étude ont été d'évaluer en premier lieu la prévalence de *L. monocytogenes* dans les carcasses de poulet et d'apprécier l'évolution de la contamination le long de la chaîne d'abattage. En second lieu, une caractérisation moléculaire de toutes les souches isolées afin de leur donner chacune une empreinte génétique pour pouvoir les tracer ultérieurement.

MATERIELS ET METHODE :

L'étude a été réalisée dans trois unités d'abattages avicoles industriels (A, B et C). 212 échantillons (carcasses de poulet) ont été prélevés au niveau de deux sites de la chaîne d'abattage, le premier étant juste après l'éviscération avant le rinçage et le second après finition, emballage et réfrigération de 24h. Le premier site de prélèvement a été choisi du fait que l'éviscération soit considérée comme étant l'étape la plus contaminante à cause de l'enlèvement manuel des viscères. Le deuxième site a été choisi pour évaluer l'évolution de la contamination après les nombreuses manipulations nécessaires à la finition du produit avant sa mise sur le marché. 52 échantillons ont été récoltés dans l'unité « A » et 80 échantillons ont été récoltés dans chacune des unités « B » et « C ». De chaque unité, la moitié des échantillons a

été récoltée au premier site de la chaîne d'abattage et l'autre moitié au deuxième.

La méthode utilisée pour la recherche de *Listeria monocytogenes* a été la méthode microbiologique ISO 11290-01. Cette méthode a nécessité deux étapes d'enrichissement dans du bouillon Fraser (Institut Pasteur d'Alger) et un double isolement sur deux milieux sélectifs Palcam (Institut Pasteur d'Alger) et Oxford (Institut Pasteur d'Alger). La confirmation du genre *Listeria* et de l'espèce *monocytogenes* ont été réalisés par des galeries miniaturisées API *Listeria* (BioMérieux) et par la recherche de l'hémolyse.

La caractérisation génotypique ou pulstypage des souches de *L. monocytogenes* isolées, réalisée à l'Institut Pasteur Paris, a été effectuée par la méthode de l'électrophorèse en champ pulsé (PFGE) suivant le protocole de PULSNET Europe (Graves et Swaminathan, 2001). Deux enzymes de restriction (*AscI* et *Apal*) ont été utilisés dans ce test. Cette méthode a pour but de déterminer les profils de macrorestriction de l'ADN chromosomique des souches. L'extraction de l'ADN et sa restriction ont été réalisées sur des cultures bactériennes empaquetées dans de l'agarose. Les deux enzymes de restrictions utilisés *Apal* (Fermantas) et *AscI* (BioLabs) ont été choisis pour leurs faibles fréquences de coupures, les macro-fragments obtenus ont été séparés sur un gel par électrophorèse en champs pulsé. Les gels ont été colorés au bromure d'éthidium et l'image prise par l'appareil de lecture (Biorad).

Les profils PFGE ont été analysés avec le logiciel BioNumerics en utilisant le coefficient de Dice et la méthode UPGMA (Unweighted Pair Group Method of Averages, méthodes des moyennes de paires non ajustées), avec une limite de tolérance de 1,5% et une optimisation de 1,5%.

RESULTATS ET DISCUSSION :

L. monocytogenes a été isolée dans les trois unités d'abattage qui ont été prospectées. Dix-neuf échantillons (19) des 212 analysés se sont avérés positifs avec une prévalence globale de 8.9%. La contamination par *L. monocytogenes* rapportée par différents auteurs dans de nombreux pays est très variable, ainsi, elle va de 0% (Svobodová et al., 2012) se rapproche des 8,9% que nous avons enregistré (Almeida et al., 2005) et atteint des valeurs nettement supérieures aux nôtres (Sjöman, 2010).

Chaque unité a montré une prévalence de contamination différente selon le site de prélèvement des carcasses. Dans l'unité « A » la contamination a atteint la prévalence de 11.5% (n=52). Au premier site de prélèvement aucune souche de *L. monocytogenes* n'a été isolée (0%)

contrairement au deuxième site (finition, emballage et réfrigération) où la contamination enregistrée a atteint 23% (6/26) (Tableau N°1).

Dans l'unité « B », la prévalence globale enregistrée a été de 5% (n=80), le schéma de contamination s'est rapproché de celui observé dans l'unité « A », aucune contamination (0%) n'a été observée au premier site de prélèvement, alors qu'au deuxième site elle a atteint les 10% (4/40 ; tableau N°1). Un résultat similaire où la contamination par *L. monocytogenes* n'apparaît qu'à la fin du processus d'abattage après finition et réfrigération a déjà été rapporté par Almeida et al. (2005).

Dans l'unité « C », la contamination par *L. monocytogenes* a été cette fois-ci détectée aussi bien au premier site de prélèvement à une prévalence de 2.5% (1/40) qu'au deuxième avec une prévalence de 20% (8/40) (Tableau N°1). La prévalence globale dans tous les échantillons prélevés dans cette unité (n=80) a atteint 11.2% (9/80).

Dans les trois unités nous avons observé que la prévalence moyenne de la contamination par *L. monocytogenes* a été de 9% environ, nous avons noté en particulier l'évolution de la contamination le long de la chaîne d'abattage, où les prévalences de contamination au premier site de prélèvement ont été négatives ou minimales, alors qu'au deuxième site les prévalences enregistrées ont varié de 10 à 23%. Ces résultats suggèrent que la contamination des carcasses de poulet dans les abattoirs surviendrait pendant les étapes de transformation, en particulier après l'étape de l'éviscération, elle augmenterait le long de la ligne d'abattage pour atteindre des niveaux très importants à la fin de la ligne d'abattage à l'étape « finition et réfrigération ». Des études antérieures confortent nos résultats (Almeida et al., 2005 ; Berrang et al., 2000 et Lopez et al., 2008).

L'évolution de la contamination le long de la chaîne d'abattage a suggéré que les sources majeures des germes au cours du processus d'abattage restent les nombreuses manipulations, l'environnement et les surfaces de contact via les machines, couteaux et autres ustensiles de l'abattoir qui seraient mal désinfectés. Miettinen et al. (2001) et Ojeniyi et al. (1996) ont rapporté ces mêmes observations et suggestions dans leurs études antérieures.

Vingt-six isolats de *L. monocytogenes* ont fait l'objet d'une caractérisation par pulstypage. Tous les isolats testés ont été typés par cette technique et tous ont donné un profil génétique.

La restriction par l'enzyme *AscI* a permis de donner à chaque souche un profil de macrorestriction, l'analyse automatisée par le logiciel Bionumerics des profils générés par cet

enzyme a permis de mesurer la similarité entre eux et de les grouper en 7 clusters. Chaque cluster ou groupe contient tous les profils indiscernables qui présentaient plus de 98% de similarité (Tenover et al., 1995). Quatre des clusters regroupaient des profils indiscernables et trois clusters présentaient chacun un profil particulier et unique. Le degré de similarité entre ces 7 clusters a atteint les 60%.

La restriction par l'enzyme *ApaI* a également donné un profil de restriction à chaque souche, l'analyse automatisée des profils générés les a regroupés en 7 clusters avec un degré de similarité de 55%. 4 des clusters contenaient les profils indiscernables et 3 clusters représentaient chacun un profil unique. Les clusters à profil unique étaient les mêmes que ceux observés après restriction à l'*AscI*.

la combinaison des profils de macrorestriction des deux enzymes en même temps, qui a un excellent pouvoir de discrimination entre les souches (Buchrieser et al., 1993) a été réalisée grâce à l'analyse automatisée (Figure N°1). Tous les profils ont été regroupés en 7 clusters (I à VII). Trois de ces clusters (I, II et III) contenaient chacun un profil unique et représentaient chacun 3.8% (1/26) des souches caractérisées (tableau N°2). Le cluster IV regroupait 10 profils et représentait 38.4% (10/26) des souches, ce qui fait de lui le cluster dominant (Tableau N°2).

La répartition des clusters de profils par unité d'abattage a montré que chaque unité possédait son profil dominant (V dans unité A ; V, VI dans unité B ; IV dans unité C), cette notion du profil dominant dans chaque unité d'abattage a été rapportée par Lopez et al. (2008) et Miettinen et al. (2001). Certains clusters ont été communs aux trois unités (le cluster V), ce résultat a suggéré que les souches proviendraient de la même région comme rapporté par Neves et al. (2008). Les trois unités ont montré chacune un profil unique qui leurs étaient spécifiques (I/unité A ; III et VI/unité B ; II et VII/unité C), cette observation a laissé supposer que ces souches pouvaient être des souches résidentes comme l'avait rapporté Fugget et al. (2007) et Wulff et al. (2006) dans leurs études où ils avaient noté que les souches particulières aux unités d'abattage étaient des souches résidentes.

CONCLUSION :

Cette étude a montré que la contamination par *L. monocytogenes* des carcasses de volailles dans les abattoirs survenait pendant les étapes du processus de transformations en particulier après l'étape d'éviscération et qu'elle augmentait le long de la ligne d'abattage pour atteindre des niveaux très importants à la fin ce processus.

La caractérisation génotypique a donné une empreinte à toutes les souches testées et a montré que chaque unité de transformation possédait un profil de souche dominant et un profil qui lui était

particulier, ce dernier pourrait être dû au phénomène des souches résidentes. Des études ultérieures axées sur ce phénomène sont requises pour confirmer ou infirmer cette supposition.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES:

1. Almeida, P. F., Barbalho, T.C.F., Almeida, R. C.C. and Hofer, E. 2005. *Food Control* 16: 211–216.
2. Berrang, M.E., Lyon, C.E. et Smith, D.P. 2000. *J. Appl. Poult. Research* 9: 546-550.
3. Bouayad, L. et Hamdi, T.M. 2012. *Food Control* 23: 397-399.
4. Buchrieser, C., Brosh, R., et Roccourt, J. 1991. *I.J. Food. Microbiol.* 14: 297-304
5. Farber, J.M., Peterkin, P.I., 1991. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol. Rev.*, 55, 476-511.
6. Fugget, E., Shonnmaker-Bopp, D., Dumas, N., Corby, J. et Wiedmann, M. 2007. *J. Clin. Microbiol.* 45: 865-873.
7. Graves, L.M. et Swaminathan, B., 2001. *Int J Food Microbiol.* 65(1-2):55-62.
8. Lopez, V., Ortiz, S., Corujo, A., Lopez, P., Navas, J., Poza, D., Moreno, R. et Martinez-Suarez, V. 2008. *Poult Sci.* 87: 1874- 1882.
9. Miettinen, M.K, Palmu, L., Björkroth, K.J. et Korkeala, H. 2001. *J. Food. Protect* 64: 994-999.
10. Neves, E., Brito, L., Lourenço, A., Silva, A.C., Coutinho, R. 2008. *Syst. Appl. Microbiol.* 31: 387-392.
11. Ojeniyi, B. Wegener, H.C., Jensen, N.E. et Bisgaard, M. 1996. *J. Appl. Bacteriol* 80: 395-401.
12. Ryser, E.T. 2007. in *Listeria, listeriosis and food safety*. E. T. Ryser and E.H. Marth, eds. CRC press, Boca Raton, FL.
13. Sjöman, M. 2010. These de doctorat. University of Helsinki. Finland.
14. Svobodová, I., Bořilová, G., Hulánková, R. et Steinhäuserová, I. 2012. *ACTA VET.* 81: 37–42.
15. Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.V., Mickelsen, P.A., Murray, B.E., Persing, D.H. et Swaminathan, B. 1995. *J. Clin. Microbiol.* 33: 2233-2239.
16. Wulff, G., Gram, L., Ahrens, P., & Fonnesbech Vogel, B. 2006. *Appl and Env Microbiol*, 72, 4313-4322.

Tableau n°1 : Prévalence de *L. monocytogenes* dans les abattoirs selon le site de prélèvement.

Site de prélèvement	Unité A (n=52)	Unité B (n=80)	Unité C (n=80)	Prévalence globale dans les 3 unités (n=212)
Après éviscération	0 %	0%	2.5%	
Après finition, emballage et réfrigération	23%	10%	20%	
Total	11.5%	5%	11.2%	8.9%

Tableau n°2 : Répartition des clusters de profils génétiques par unité d'abattage

Clusters Unité	I	II	III	IV	V	VI	VII
Unité A	12.5%	0%	0%	12.5%	75%	0%	0%
Unité B	0%	0%	16.3%	16.3%	33.3%	33.3%	0%
Unité C	0%	7.7%	0%	61.5%	7.7%	0%	23%
Total (n26)	3.8%	3.8%	3.8%	38.4%	30.7%	7.7%	11.5%

Figure n°1 : Profils génétiques générés par les restrictions aux enzymes à l'*ApaI* et l'*AscI* et leurs degrés de similarité

