



Expériences de Listeria consulting - Colloque du 29 août 2019

Auteurs

Thomas Berger, Lena Fritsch, René Imhof, Ernst Jakob, Thomas Stanke,
Alicia Romanó



Impressum

Éditeur :	Agroscope, Schwarzenburgstrasse 161, 3003 Bern www.Agroscope.ch
Renseignements :	Thomas Berger
Rédaction :	Thomas Berger
Photo de couverture :	Ernst Jakob, Agroscope
Download:	www.agroscope.ch/transfer
Copyright:	© Agroscope 2019
ISSN:	2296-7230 (online)

Table des matières

1. 30 ans de programme de surveillance de la <i>Listeria</i>	4
2. Lignes directrices sur la prévention de la listériose dans l'industrie.....	5
3. Expérience de conseil du point de vue d'une entreprise industrielle	8
4. Potentiel du Whole Genome Sequencing	9
5. Potentiel du MALDI-TOF	11
Bibliographie	13

Cinq conférenciers ont résumé les expériences de 30 ans de consultation et de prévention de Listeria sous différents angles et ont montré ce qui est possible aujourd'hui avec les techniques modernes telles que le séquençage du génome entier et MALDI-TOF.

1. 30 ans de programme de surveillance de la Listeria

René Imhof (Agroscope) a jeté un regard rétrospectif sur "30 ans de programme de surveillance de la Listeria". Le début du Programme de surveillance de la listériose remonte à l'épidémie de listériose de 1983-1988, causée par le fromage Vacherin Mont d'Or (122 cas ont entraîné 33 décès ; Anonymous, 1986, Anonymous, 1988, Büla et al., 1995). Agroscope, ou l'Institut de recherche laitière de l'époque, a été chargé de mettre sur pied un laboratoire pour la détection de la listériose et de définir des mesures pour éviter que de tels événements ne se reproduisent.

Listeria sont des survivants dangereux. Ils survivent à notre système immunitaire et survivent à l'intérieur des phagocytes du système immunitaire. En outre, ce sont des opportunistes qui, chez *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*), entraînent des risques particuliers pour la santé des personnes dont le système immunitaire est affaibli, ainsi que pour les femmes enceintes, les jeunes et les personnes âgées, le groupe appelé YOPI (Anglais : «young (newborne), old, pregnant or immuno compromised people = personnes jeunes, âgées, enceintes ou immunodéprimées). Bien que d'autres infections bactériennes soient plus fréquentes, la proportion de l'évolution fatale de la listériose est particulièrement élevée.

Agroscope a ensuite mis en œuvre trois mesures :

1. laboratoire d'analyse de la listériose

Au début, la détection de la listériose prenait 65 jours (1985), mais en 1993, il était possible de détecter la listériose en moins de 10 jours grâce à des améliorations continues, et depuis 2006, il était déjà possible de détecter la listériose en 48 heures.

2 Le Programme de surveillance de la listériose (LMP)

L'introduction de contrôles réguliers dans deux boucles de contrôle (fromageries et entrepôts commerciaux) a permis d'éviter la mise sur le marché de fromages contaminés, ce qui a également assuré les exportations de fromage. La première phase, de 1990 à 2001, a nécessité beaucoup d'efforts et d'analyses pour sensibiliser, former, conseiller et aider à l'assainissement des exploitations touchées et à l'élaboration de mesures d'assurance qualité dans les exploitations. De 2002 à 2009, les coûts ont été réduits, l'assurance qualité optimisée et les HACCP introduits. Dans le même temps, Agroscope a réorienté ses activités vers le conseil et l'accompagnement des consultants régionaux. La législation en matière d'hygiène a également été adaptée au cours de cette période et la LMP a été régionalisée. L'ancienne forme du LMP est obsolète depuis 2010 et a été réduite à un mandat résiduel.

3. L'équipe consultative Agroscope Listeria

Pour les problèmes liés à la listériose, l'équipe de consultants d'Agroscope peut être sollicitée pour aider et conseiller sur l'assainissement opérationnel. L'équipe se compose de 3 à 4 membres issus de différents domaines (technologie de fabrication, hygiène et microbiologie). Si nécessaire, l'équipe peut faire appel à des connaissances spécialisées ou à d'autres experts des domaines spécialisés d'Agroscope. Dans un premier temps, l'état réel est enregistré (figure 1) et la présence de listériose en général et de *L. monocytogenes* en particulier est étudiée (échantillons d'air ambiant, d'eau lubrifiante et de produits).

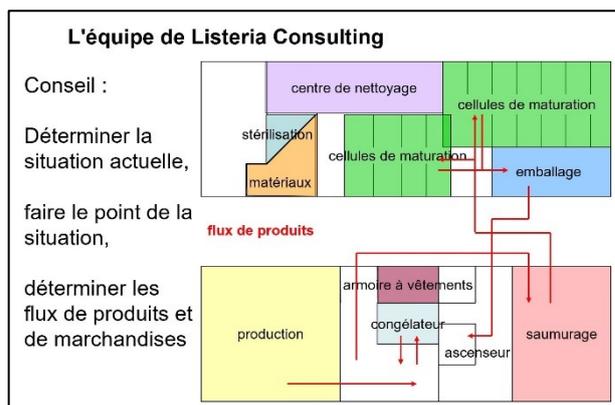


Fig. 1 : Détermination de l'état actuel de la consultation sur la listériose

Les flux de produits et de marchandises sont déterminés et les résultats sont incorporés dans une analyse des risques et des points faibles (figure 2), qui aboutit ensuite à des propositions de restructuration à la troisième étape (figure 3).

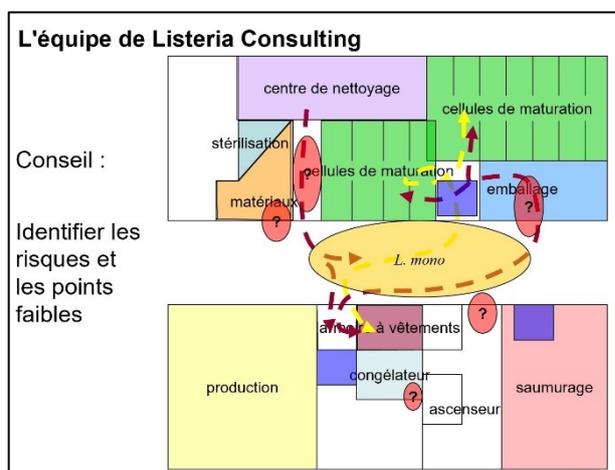


Fig. 2 : Description du risque et des points faibles de Listeria Consulting

Une attention particulière est également portée aux planches pour l'affinage des fromages. Ils doivent être traités thermiquement à la vapeur, ce qui équivaut à la pasteurisation. Les expériences du LMP et des rénovations de l'entreprise ont ensuite été miniaturisées pour les fermes alpines, qui peuvent construire elles-mêmes un simple kit de traitement à la vapeur (Figure 4). Les instructions se trouvent à l'adresse suivante: [Imhof & Riva Scettrini, 2015](#)

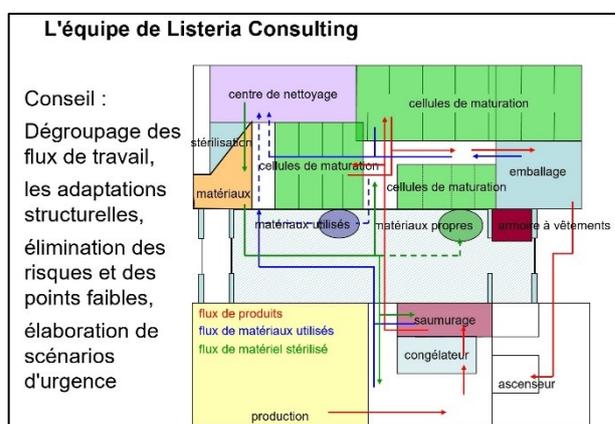


Fig. 3 : Détermination de l'état cible dans le conseil sur la listériose



Fig. 4 : Cellule à vapeur modulaire pour les Alpes et les petites entreprises

L'utilisation du bois dans l'affinage du fromage faisant l'objet d'une controverse internationale, l'efficacité du traitement à la vapeur a été démontrée et publiée dans une expérience (Imhof et al. 2017; Anonymous, 2016a). Ceci réfute l'argument critique selon lequel le bois peut être hygiéniquement préparé pour une utilisation en contact avec les aliments par traitement thermique dans une chambre à vapeur.

Un groupe de recherche d'Agroscope travaille sur les cultures protectrices de la *Listeria*. LMP et les consultants en gestion n'ont pas d'expérience directe avec les cultures de protection ou les produits à base de phages pendant les mesures correctives dans des situations d'escalade. Dans les cas de listériose aiguë, ces produits n'ont pas encore montré d'effet durable dans une situation de listériose aiguë. Les clients ne sont donc pas encouragés à utiliser ces produits avant d'avoir fait leurs devoirs. L'efficacité de ces produits à usage préventif n'a pas encore été démontrée.

Une stratégie d'hygiène réussie repose sur les facteurs suivants :

- de vivre un système de gestion de la qualité discipliné au sein de l'entreprise,
- le principe du lot,
- sensibilisation et formation du personnel,
- utilisation des bonnes pratiques de fabrication, du système HACCP et du concept d'hygiène.

2. Lignes directrices sur la prévention de la listériose dans l'industrie

Ernst Jakob (Agroscope) a montré comment la "Prévention de la *Listeria* dans les directives industrielles" peut être mise en œuvre avec succès. Les chiffres du système européen d'alerte rapide pour les denrées alimentaires et les aliments pour animaux (RASFF) montrent où se situent les problèmes liés à *L. monocytogenes* et au fromage. Les notifications RASFF sur la présence de *L. monocytogenes* dans le fromage entre 2009 et 2019 font état d'un nombre de germes compris entre 0,1 et 1 800 000 unités formant colonies (UFC)/g, dont 44 % >100 *L. monocytogenes* (UFC)/g (Figure 5).

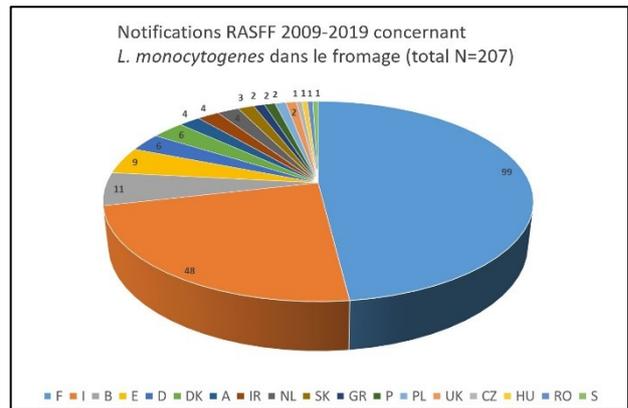


Fig. 5 : Notifications RASFF 2009-2019 concernant *L. monocytogenes* dans les fromages triés par pays

La plupart des notifications provenaient de France, d'Italie et de Belgique, aucune de Suisse. La figure 6 montre que les fromages à pâte molle sont les plus susceptibles d'être affectés en termes de fermeté, bien que dans de nombreux cas, le type de fromage n'ait pas été spécifié plus précisément.

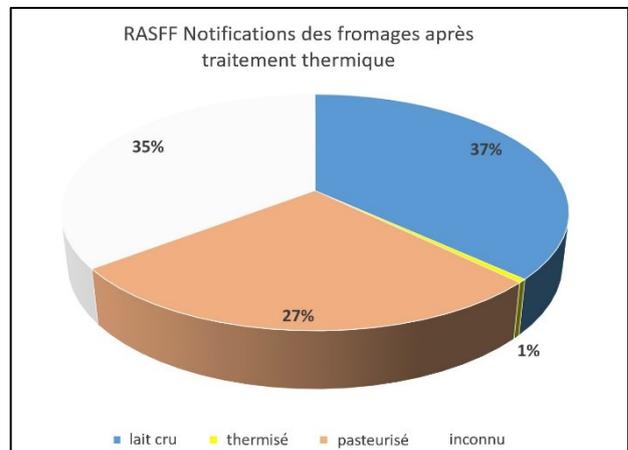


Fig. 6 : Notifications RASFF 2009-2019 concernant *L. monocytogenes* dans les fromages triés par traitement thermique

La figure 7 et le tableau 1 sont également importants pour la mise en œuvre efficace de la prévention de la listériose, car contrairement à la croyance populaire, non seulement le fromage au lait cru est un produit essentiel, mais très souvent le fromage au lait pasteurisé, car les problèmes de listériose sont souvent dus à la recontamination. Les fromages à longue maturation sont même des produits très sûrs, car la probabilité d'y trouver de la listériose est faible (Anonymous, 2017).

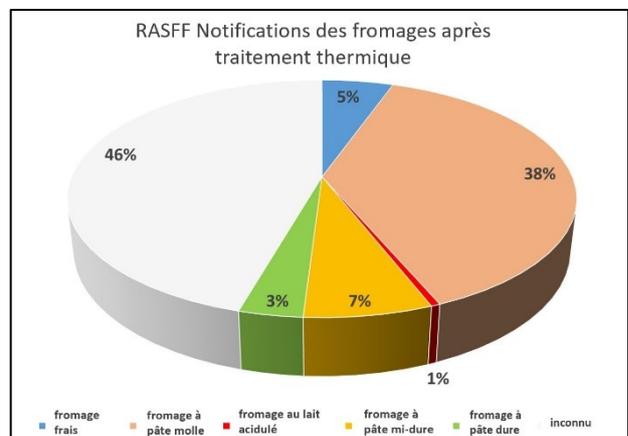


Fig. 7 : Notifications RASFF 2009-2019 concernant *L. monocytogenes* dans les fromages triés par type de fromage (consistance de pâte).

Country	Sampling unit	Details	Units Tested Presence		L. m. presence in 25 g		Units Tested Enumeration		> detection <= 100 cfu/g	L. m. > 100 cfu/g
			N	% Pos	N	%	N	%		
Cheeses made from milk from cows										
Bulgaria	Batch	at retail	2,502	0	231	0	0			
Czech Republic	Batch	at processing	3,523	1.7	2,153	0	0			
Germany	Single	at processing	682	1.3	214	0	0			
	Single	at retail	3,172	0.5	1,621	0.1	0.2			

Tab. 1 : *L. monocytogenes* dans le fromage à pâte dure fabriqué à partir de lait pasteurisé (selon l'évaluation des programmes nationaux de recherche de l'UE, EFSA Community Summary Report 2008, A. Lutz, BLV, 2010)

La surveillance de l'environnement est prescrite par la loi conformément à l'art. 69 de l'Ordonnance sur l'hygiène "Échantillonnage des lieux de transformation et des équipements" (OHyg, 2018) :

Les établissements du secteur alimentaire qui fabriquent des denrées alimentaires prêtes à la consommation susceptible de présenter un risque pour la santé humaine lié à *Listeria monocytogenes*, doivent prélever des échantillons, sur les lieux de transformation et sur les équipements utilisés, en vue de détecter la présence de *Listeria monocytogenes* dans le cadre de leur plan d'échantillonnage.

O du DFI sur l'hygiène						817.024.1
Catégorie de denrées alimentaires	Microorganismes/toxines, métabolites	Plan d'échantillonnage		Limites	Méthode d'analyse de référence	Stade d'application du critère
		n	c			
1.2 Denrées alimentaires prêtes à la consommation permettant le développement de <i>L. monocytogenes</i> , autres que celles destinées aux nourrissons ou à des fins médicales spéciales	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	100 UFC/g ¹⁸	EN/ISO 11290-2 ¹⁹	Produits mis sur le marché pendant leur durée de conservation
		5	0	Non décelable dans 25 g ²⁰	EN/ISO 11290-1	Avant que la denrée alimentaire n'ait quitté le contrôle immédiat de la personne responsable de l'établissement de fabrication
1.3 Denrées alimentaires prêtes à la consommation ne permettant pas le développement de <i>L. monocytogenes</i> autres que celles destinées aux nourrissons ou à des fins médicales spéciales ^{21 22}	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	100 UFC/g	EN/ISO 11290-2 ²³	Produits mis sur le marché pendant leur durée de conservation

¹⁸ La personne responsable doit être en mesure de démontrer, à la satisfaction de l'autorité d'exécution compétente, que le produit respecte la limite de 100 UFC/g pendant toute la durée de conservation.
¹⁹ 1 ml d'inoculum est déposé sur une boîte de Petri d'un diamètre de 140 mm ou sur trois boîtes de Petri d'un diamètre de 90 mm.
²⁰ Ce critère est applicable aux produits avant qu'ils ne quittent le contrôle immédiat de la personne responsable de l'établissement de fabrication, lorsque celle-ci n'est pas en mesure de démontrer, à la satisfaction de l'autorité d'exécution compétente, que le produit respecte la limite de 100 UFC/g pendant toute la durée de conservation.
²² Les produits pour lesquels pH ≤ 4,4 ou a_w ≤ 0,92, les produits pour lesquels pH ≤ 5,0 et a_w ≤ 0,94 et les produits à durée de conservation inférieure à cinq jours appartiennent automatiquement à cette catégorie. D'autres catégories de denrées alimentaires peuvent aussi appartenir à cette catégorie, sous réserve d'une justification scientifique.

Fig. 8 : Exigences légales pour *L. monocytogenes* (OHyg, 2018)

Les deux limites légales (figure 8) de "non détectable dans 25 g" et "≤ 100 UCF/g" pour les produits dans lesquels *L. monocytogenes* ne peut se reproduire pendant toute la durée de conservation doivent également être respectées, comme le prouvent les tests de provocation.

D'autres informations utiles sont fournies par l'expérience acquise lors de la consultation. La figure 9 énumère quelques cas de consultation des années 2003 à 2009. Les cas marqués montrent l'influence sérieuse d'erreurs de processus (absence de temps de rétention de chaleur lors de la thermisation) et de la contamination croisée, ici par un bain de sel contaminé.

Les directives industrielles suivantes sont actuellement disponibles conformément au Règlement (CE) n° 852/ 2004 (Règlement (CE) No 852/2004, 2009) et à l'article 80 de l'ordonnance sur les denrées alimentaires et les objets usuels (ODAI, 2019) :

année		lait	pâte	croûte	cause des erreurs
2003	fromage à pâte mi-dure	lait cru	pos	pos	un producteur a fourni du lait contaminé tous les jours
2005	fromage à pâte molle avec molesse blanche	pasteurisé	?	pos	contamination croisée avec des frottis de fromages rouges à maturation externe
2006	fromage à pâte mi-dure	partiellement thermisé (lait du soir)	neg	pos	machine de graissage
2007	fromage à pâte mi-dure (alpin)	lait cru	pos	pos	lait contaminé (10 - 100 UFC/ml)
2007	Raclette	pasteurisé	neg	pos	fuite d'eau du réseau d'égout dans la cave après l'indonation
2008	fromage à pâte molle	thermisé	pos	pos	listeriose du pis d'une vache, thermisation à 65 °C sans temps de maintien à chaud
2008	fromage à pâte mi-dure	lait cru	?	pos	cave commerciale, source de contamination inconnue
2008	fromage à pâte mi-dure	thermisé	neg	pos	inconnu, production parallèle d'Emmental ?
2008	fromage à pâte mi-dure	lait cru	pos	pos	inconnu
2009	fromage de brebis à pâte molle type Brie	pasteurisé	?	pos	Listeria dans un bain de sel d'Emmental, contamination croisée
2009	fromage à pâte mi-dure	lait cru	?	pos	lait partiellement positif → agrégat de traite contaminé (tuyau d'aspiration) chez un producteur de lait
2009	fromage à pâte molle	thermisé	pos	pos	fournisseur de lait (salle de traite mobile, eau de citerne)
2009	fromage à pâte mi-dure (alpin)	lait cru	pos	pos	inconnu (position de la pâte < 10 UFC/g), position de l'eau lubrifiante, position du bain de sel)
2009	fromage à pâte mi-dure	thermisé	neg	pos	inconnu (négatif bain de sel)

Fig. 9 : Consultations Agroscope 2003 - 2009, importance des erreurs de processus et de la contamination croisée

- European Guide for Good Hygiene Practices in the production of artisanal cheese and dairy products (FACE, Farmhouse and Artisan Cheese & Dairy Producers Network) – 2016 (Anonymus, 2016b)
- MQ-Fromarte (fromageries) – 2008 (Anonymus, 2008)
- SSEA Guide de production (exploitations d'estivages) – 2015 (Jakob & Menéndez González, 2015)

Toutes les directives de l'industrie sont fondées sur le système HACCP. Les mesures énumérées dans le tableau 2 font partie de la maîtrise des risques.

Quoi	Comment
Formulations validées	Validation dans le cadre d'une étude HACCP
Minimiser l'apport de matières premières	Surveillance des matières premières Entreposage frigorifique du lait cru Traitement thermique, etc.
Empêcher l'entrée par l'environnement	Zones d'hygiène Bonnes pratiques de fabrication Surveillance environnementale
Survie, minimisation de la croissance	Recette (température de cuisson, temps de maturation, etc.) Surveillance du processus Contrôles d'hygiène des procédés
Produit fini	Contrôles de l'hygiène des procédés Contrôles du produit fini Datant

Tab. 2 Mesures de contrôle importantes pour les entreprises fromagères

Les conditions de production selon le cahier des charges des fromages à "Appellation d'Origine Protégée" AOP (statut 28.02.2018) doivent également être respectées. Toutefois, il existe également des exigences qui entraînent une augmentation du risque de listériose, par exemple pour le Vacherin fribourgeois avec des conditions de stockage du lait allant jusqu'à 18 °C, jusqu'à un maximum de 24 heures et une thermisation facultative (tableau 3). La sécurité alimentaire est bien sûr garantie, mais pas facile.

variété de fromage	thermisation	température de cuisson	stockage du lait	temps de maturation minimal	
Berner Alpkäse	pas autorisé	≥ 50 °C	n.s. (18 °C)	≤ 15 h	4,5 mois
Emmentaler	pas autorisé	52 – 54 °C	n.s. (18 °C)	≤ 24 h	4 mois
Etivaz	pas autorisé	≤ 57 °C	max. 18 °C ²	≤ 18 h	135 jours
Formaggio d'alpe ticinese	pas autorisé	41 – 50 °C	n.s. (18 °C)	≤ 18 h	60 jours
Glarner Alpkäse	pas autorisé	44 – 47 °C	< 13 °C	≤ 24 h	60 jours
Gruyère	pas autorisé	54 – 57 °C	12 à 18 °C	≤ 18 h	5 mois
Sbrinz	pas autorisé	54 – 57 °C	n.s. (18 °C)	≤ 24 h	18 mois
Tête de Moine	pas autorisé	44 -53 °C	≤ 18 °C ³	≤ 18 h ³	75 jours
Vacherin fribourgeois	en option (ALP pos.) ¹	30 -36 °C	n.s. (18 °C)	≤ 24 h	70 jours
Vacherin Mont d'Or	57 à 68 °C ≤ 15s (ALP pos.)	32 – 38 °C	10 – 18 °C	≤ 20 h	17 jours
Walliser Raclette	pas autorisé	36 – 45 °C	< 8 °C ⁴	≤ 24 h	3 mois
Werdenberger/Liechtensteiner Bliederkäse	peut : 55 -69 °C/≥ 15s (ALP pos.)	≤ 45 °C / pH < 4.65	n.s. (18 °C)	≤ 24 h	aucun
Werdenberger/Liechtensteiner Sauerkäse	peut : 55 -69 °C/≥ 15s (ALP pos.)	≤ 45 °C / pH < 4.65	n.s. (18 °C)	≤ 24 h	2 mois

n.s. = non spécifié, c'est-à-dire que les exigences légales s'appliquent (max. 18 °C)
 ALP pos. = La réaction de phosphatase alcaline doit être positive après le traitement
¹ la température et le temps ne sont pas définis
² température maximale du lait du soir stocké le matin
³ si le lait est refroidi en dessous de 8 °C, il peut être conservé pendant 24 heures au maximum
⁴ les exploitations d'élevage peuvent stocker du lait à < 13 °C

Tab. 3 : Sélection des exigences pour les fromages bénéficiant de « l'appellation d'origine protégée » AOP selon leur cahier des charges (au 28.02.2018). Certains critiquent la prévention de la listériose.

Outre les facteurs mentionnés ci-dessus, la qualité des matières premières est également décisive pour la fabrication de produits sûrs. Contrairement à d'autres pays (tableau 4), où la prévalence de Listeria dans le lait atteint près de 20%, le lait cru provenant de vaches non nourries à l'ensilage est déterminant en Suisse et ne représente que 0,33% (Imhof, 2014).

Type d'échantillon	Nombre d'échantillons	Prévalence %	Pays (année de publication)
Lait de tank ferme	294	1.0	Suède (2002)
Lait de silo laiterie	295	19.5	Suède (2002)
Lait de tank ferme	861	6.5	USA (2004)
Lait de tank ferme	113	5.3	Irlande du Nord (1992)
Lait de silo laiterie	113	33.3	Irlande du Nord (1992)
Lait de tank ferme	948	5.9	USA (2003)
Lait de tank ferme	774	3.6	Espagne (1998)
Lait de tank ferme	131	4.6	USA (2001)
Lait de tank ferme	1720	2.7	Canada (1997)
Lait de tank ferme	589	7.9	Irlande (1992)

Tab. 4 : Prévalence de L. monocytogenes dans le lait cru (Kuushta M. et al, European Dairy Magazine, No. 2, 2010)

D'autres facteurs critiques sont la croissance de L. monocytogenes dans le lait en fonction de la température et de la durée d'entreposage (figure 10) et l'influence du traitement thermique sur la réduction des germes en fonction de la température à une durée de 15 s (tableau 5).

Le temps de maturation du fromage au lait cru a également une influence sur la survie de L. monocytogenes. Bachmann & Spahr ont pu démontrer en 1995 que L. monocytogenes n'était plus détectable dans le fromage à pâte dure après seulement un jour, alors que dans le fromage à pâte mi-dure, même après 90 jours, L. monocytogenes était seulement réduit à environ un dixième du nombre de bactéries initial.

Les figures 11 et 12 montrent de façon exemplaire quelles exigences relatives à L. monocytogenes doivent être tirées des connaissances connues afin de contrôler le risque de Listeria.

En résumé, les directives de l'industrie laitière suisse (MQ-Fromarte et SSEA Guide de production) s'appliquent :

- ils sont basés sur le système HACCP,
- ils interprètent les exigences légales d'une manière pragmatique mais scientifiquement fondée,
- le MQ-Fromarte est certifiable (contrôle de mise en œuvre par des audits réguliers),
- le cas échéant, les exploitations agricoles sont soutenues dans la mise en œuvre des lignes directrices par les consultants laitiers des plates-formes consultatives régionales.

Par conséquent, il y a très peu de rappels de fromage suisse dus à la listériose.

L'expérience suisse a été résumée avec l'expérience allemande et autrichienne dans le "InterLab Guide to Listeria in Milk Products" (figure 13).

Les auteurs y déclarent leur soutien à la production de fromage sans listériose (pas d'utilisation de la valeur limite de "≤ 100 UFC/g"). Les lignes directrices (InterLab,

2018) et un article de synthèse (Becker, 2017) se trouvent sous les liens suivants :

- [Guide, site web, Agroscope, Liebefeld](#)
- [Guide, site web HBLFA Tirol, Rotholz](#)
- [Guide, site web, MUVA, Kempten](#)
- [Article de synthèse, B&L Medien Gesellschaft, Hilden](#)

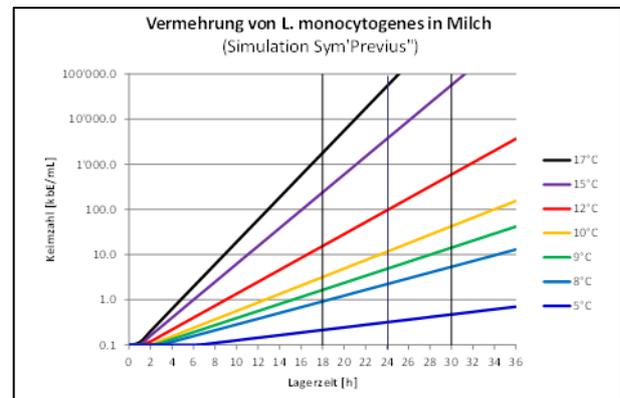


Fig. 10 : Propagation de L. monocytogenes dans le lait à différentes températures calculées avec Sym'Previus

Température	Temps de maintien	Réduction des germes	
		Listeria monocytogenes ¹	Salmonella spp. ²
57 °C	15 s	<0,1 log	0,2 log
62 °C	15 s	0,2 log	1,5 log
65 °C	15 s	0,7 log	5,7 log
68 °C	15 s	2,0 log	>7 log

¹ Base de calcul : valeur D à 65 °C dans le lait : 21,6 s, valeur z : 6,7 °C (Sörqvist, 2003)
² Base de calcul : valeur D à 65 °C dans différents milieux : 2,6 s, valeur z : 5,2 °C pour Salmonella spp. sans S. senftenberg (Sörqvist, 2003)

Tab. 5 : Influence du traitement thermique sur la réduction des germes de L. monocytogenes dans le lait (Sörqvist, 2003)

Fromage à pâte dure, thermisé à 65 °C/15 s (ou au moins équivalent)
Plan HACCP

oPRP	Critère	Matériau de l'échantillon	Fréquence*	Spécification
oPRP5 (salage)	Listeria spp.	Saumure (stabilisée avec CaCO ₃ si nécessaire)	8 x par an ou 1/180 lots	n.d. / 25 g,ml
oPRP6 (maturation)	Listeria spp.	Lubrification de l'eau après le soin du fromage (pour le fromage rouge) ou de l'échantillon de croûte (grattage)	8 x par an ou 1/45 lots	n.d. / 25 g

* Fréquence minimale (valide seulement si aucune listériose n'a été détectée dans une série de n=5 échantillons)

Fig. 11 : Plan HACCP pour L. monocytogenes pour le fromage à pâte mi-dure à la ferme, révision 2019 de la MQ-Fromarte
 oPRP = programmes préalables opérationnels (Anglais „operational prerequisite programs“); n.d. = non détectable

Fromage à pâte mi-dure, thermisé à 65 °C/15 s (ou équivalent min.)
Demande dans la distribution (fin DCM)

Critère	Matériau de l'échantillon	Spécification
Listeria monocytogenes	partie comestible, si nécessaire avec croûte	n.d. / 25 g,ml

Fig. 12 : Plan HACCP concernant L. monocytogenes pour le fromage à pâte mi-dure sur le marché, révision 2019 de la MQ-Fromarte
 DCM = date de durée de conservation minimale ; n.d. = non détectable

3. Expérience de conseil du point de vue d'une entreprise industrielle

Thomas Stanke (Sachsenmilch) a fait part de son "Expérience de consultant du point de vue d'une entreprise industrielle". Dans sa présentation impressionnante, Thomas Stanke a montré que les expériences de Listeria Consulting peuvent être transférées des exploitations alpines à la transformation industrielle dans les fromageries villageoises et aussi aux grandes entreprises industrielles. L'équipe de consultants Listeria est utilisée de manière purement préventive et a pour mission d'étouffer toute cécité dans l'œuf.

En plus des mesures habituelles visant à éviter les problèmes de listériose, les analyses les plus sensibles sont utilisées dans les opérations à grande échelle (figure 14) pour détecter et éliminer les résidus de la sous-espèce listeria dans les échantillons environnementaux. Le cas échéant, des mesures structurelles sont prises immédiatement. Cela permet de produire du fromage sans Listeria même en grande quantité et de s'affirmer sur le marché.

InterLab Leitfaden

Listerien in Milchprodukten
 InterLab dankt der Fa. Funke-Dr. N. Gerber Labortechnik für die Unterstützung!

Unsere Autoren: Becker, H.¹; Berger, T.²; Elisabeth-Lechner, F.³; Jakob, E.⁴; Knöbelseder, M.⁴; Mairlbauer, E.; Westermair, T.; Zangerl, P.³

¹ Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München (Deutschland)
² Agroscope Institut für Lebensmittelwissenschaften ILM, Liebefeld (Schweiz)
³ HBLFA Tirol, Standort Forschung und Service Reihholz (Österreich)
⁴ MUVa Kempten GmbH (Deutschland)

Der Krankheitserreger Listeria (L.) monocytogenes stellt nach wie vor eine große Herausforderung für Käseherren dar. Listerien sind eine der häufigsten Ursachen von Rückfälligkeiten aus mikrobiologischen Gründen bei Lebensmittel. Abgesehen von möglichen schweren Erkrankungen beim Menschen können daher Kontaminationen der Lebensmittel mit L. monocytogenes zu großen wirtschaftlichen Verlusten für den Lebensmittelunternehmer führen. Das Vorhandensein von zwei unterschiedlichen Grenzwerten (nicht nachweisbar in 25 g versus 100 koloniebildende Einheiten pro Gramm) macht es zudem schwieriger zu entscheiden, wie mit positiven Ergebnissen umgegangen werden soll.

Aus diesem Grund hat die Internationale Gemeinschaft der Laboratoriumsleiter in der Lebensmittelwirtschaft (InterLab) einen Leitfaden für Listerien in Milchprodukten ausgearbeitet¹⁵. Der Leitfaden gibt Empfehlungen zur Umsetzung der Vorgaben der Verordnung (EG) Nr. 2073/2005¹⁶ über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel und zur Beurteilung der Verkehrsfähigkeit gemäß Verordnung (EG) Nr. 1831/2002 (Basisverordnung)¹⁷. Der Leitfaden dient als Hilfsmittel für mikrowirtschaftliche Be-

Fig. 13 : Article de synthèse sur le "Guide InterLab sur la Listeria dans les produits laitiers" (Becker, 2017)



Fig. 14 : Transformation du lait dans la grande usine de Sachsenmilch, Leppersdorf

4. Potentiel du Whole Genome Sequencing

Lena Fritsch (Anses) a fourni des informations sur le "Potentiel du Whole Genome Sequencing". Cette technique relativement nouvelle possède actuellement la capacité discriminatoire la plus élevée et permet d'identifier de nouvelles corrélations (figure 15).

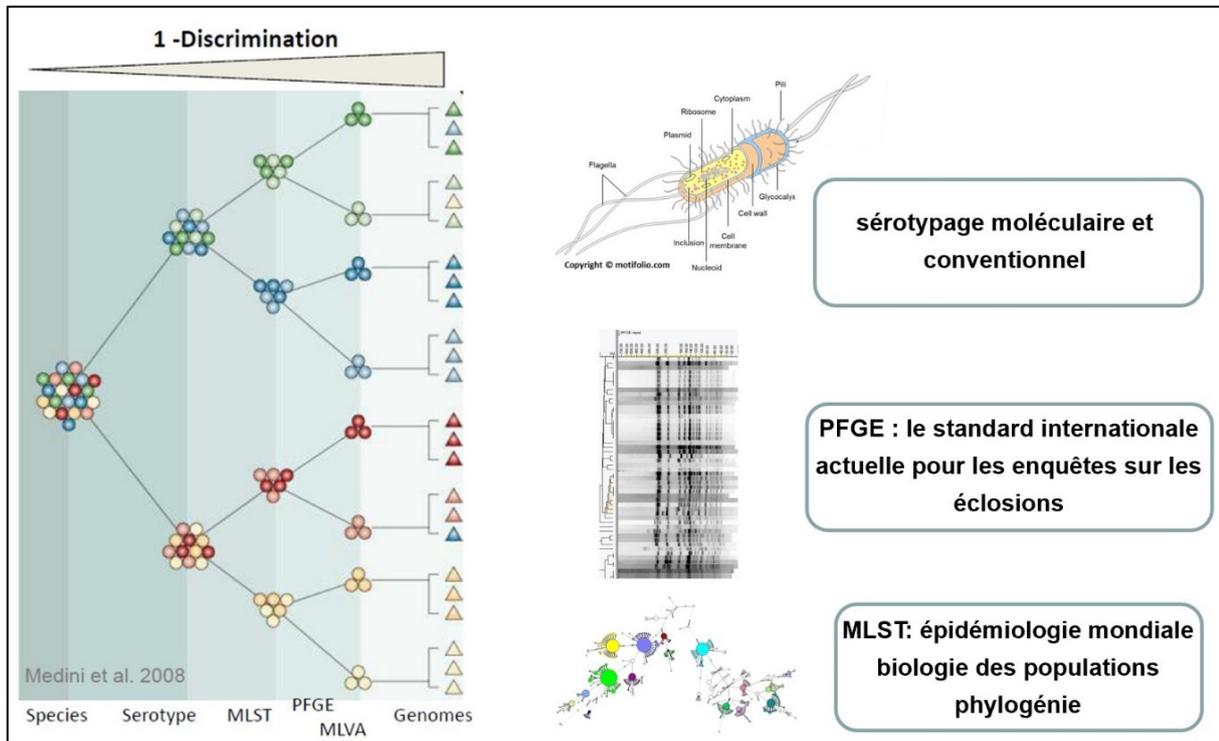


Fig. 15 : Vue d'ensemble des techniques de typage disponibles pour *L. monocytogenes*

Dans le Whole Genome Sequencing (WGS), la bactérie à étudier est retirée d'une culture pure, l'ADN est extrait, puis séquencé. Les "reads" qui en résultent sont ensuite assemblés, c'est-à-dire réassemblés dans le génome maintenant connu. Toutes les variantes génomiques peuvent également être identifiées par rapport au génome de référence (figure 16).

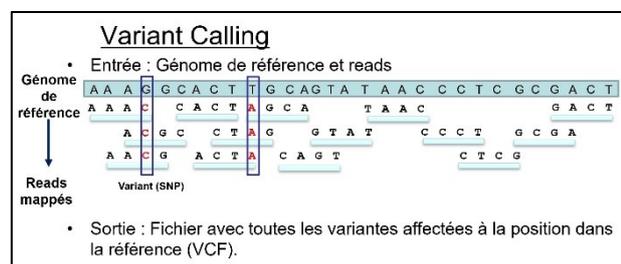


Fig. 16 : Identification des variants génomiques par comparaison des lectures avec un génome de référence

Les informations génétiques ainsi obtenues peuvent être utilisées, par exemple, pour clarifier les foyers, identifier les marqueurs génétiques, effectuer des évaluations des risques et identifier les sources des foyers.

Le WGS permet aux industriels de l'agroalimentaire

- une clarification rapide et efficace des causes de contamination (p. ex. ingrédients) et des causes de la contamination

- une distinction entre les contaminations nouvelles et les contaminations récurrentes (persistantes) (Jackson, 2016)

L'introduction du WGS a déjà permis

- une identification plus fréquente et plus rapide des sources d'éclosion dans la surveillance de la listériose (voir aussi la figure 17) et
- une augmentation du nombre total de cas associés aux éclosions identifiés.

Cependant, les distances SNP (Single Nucleotide Polymorphism, Anglais pour le polymorphisme des nucléotides simples, nom donné à une variation d'une paire de bases dans un double brin d'ADN), la topologie de l'arbre, l'inclusion des données épidémiologiques et les informations de traçabilité doivent être prises en compte. Il s'agit là d'une information importante parce que

- les populations bactériennes ont des niveaux différents de diversité génétique,
- la dérive génétique, la sélection naturelle, etc.,
- les techniques d'isolement et les caractéristiques culturelles

jouent également un rôle important et s'ils ne sont pas observés, ils peuvent conduire à des résultats faussement positifs. La figure 18 en donne un exemple.

Il y a encore place à l'amélioration dans l'utilisation du WGS dans les enquêtes sur les éclosions. Il s'agit

- des liens entre le WGS et les données de dactylographie utilisées jusqu'à présent (sérotype, complexe clonal CC),
- des informations sur la discrimination entre les résultats (nécessite des compétences en bio-informatique),
- de la diffusion des informations du WGS et de la réglementation des droits y afférents (par exemple, droits d'accès aux bases de données),
- du stockage durable des données et
- de la normalisation de la technologie.

Jusqu'à présent, peu de recherches ont été menées sur les marqueurs génétiques, l'évaluation des risques basée sur le WGS et l'attribution aux sources d'éclosion.

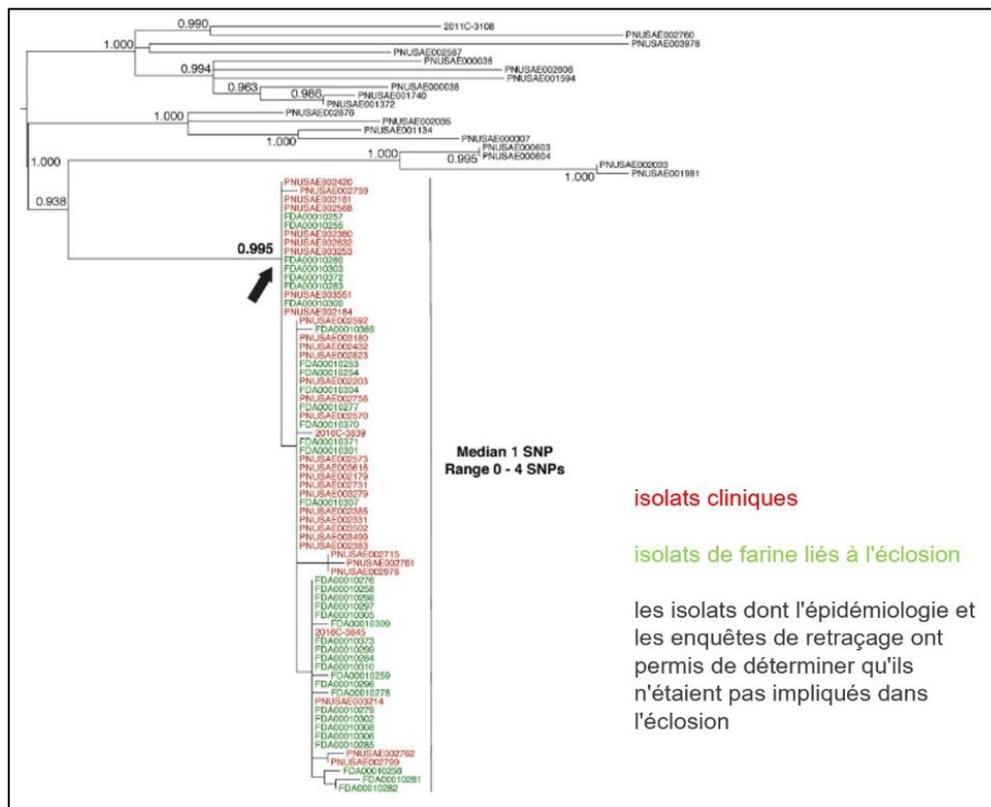


Fig. 17 : Comparaison des séquences de *Listeria* provenant d'échantillons cliniques et d'échantillons de farine dans la clarification d'un foyer (Pightling, 2018)

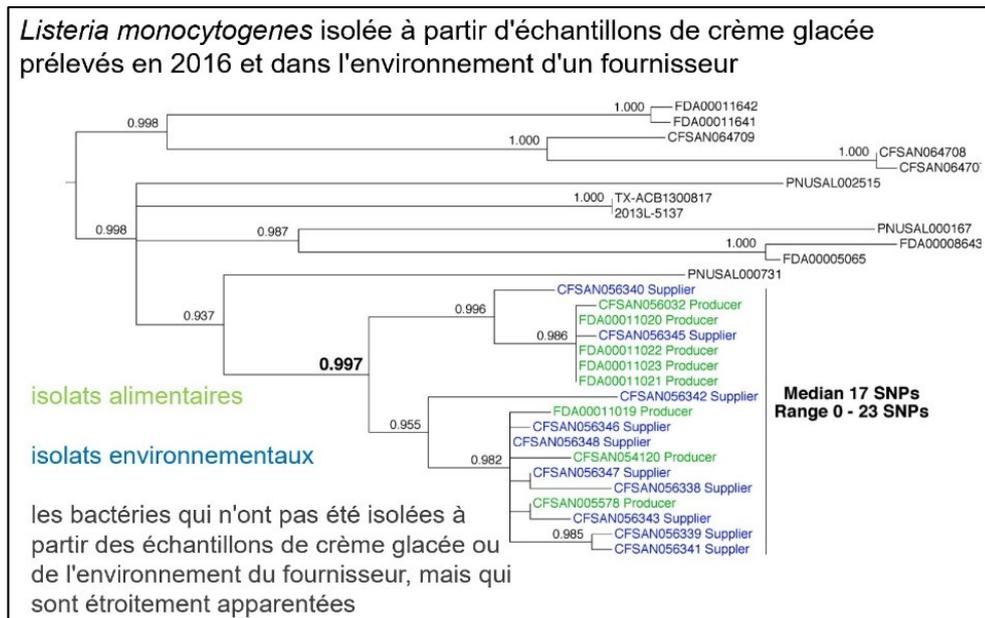


Fig. 18 : Exemple d'identification faussement positive d'isolats de *L. monocytogenes* provenant d'un échantillon de crème glacée et d'échantillons environnementaux d'un fournisseur (Pightling, 2018)

Afin d'identifier les marqueurs génétiques, nous devons mener des études d'association. Ils pourraient aider à identifier les différences phénotypiques entre les souches (p. ex. persistance, résistance aux antibiotiques, virulence ou tolérance au stress). Ces informations pourraient conduire à une meilleure identification des dangers, à des ajustements dans la gestion des risques en matière de sécurité sanitaire des aliments, à des améliorations de la microbiologie prédictive des aliments et à des améliorations dans l'évaluation des risques (plus ciblées sur les sous-populations d'organismes pathogènes à haut risque).

Lorsque l'on classe les sources par foyer, on constate que l'exposition la plus élevée (près de 52 %) concerne les souches les moins virulentes, tandis que le contact avec les souches très virulentes se produit dans moins de 10 % des cas. Les souches virulentes sont réparties différemment entre les différents aliments (figure 19).

En résumé, on peut dire que le WGS :

- fournit l'approche "one in all",
- présente un fort potentiel de discrimination, ce qui apporte une valeur ajoutée aux enquêtes sur les foyers,
- permet de nouvelles applications prometteuses,
- présente encore des lacunes dans l'harmonisation des critères de qualité et la normalisation,

- a encore des problèmes à résoudre pour rendre les données disponibles,
- lorsque l'EFSA est reconnue et utilisée.

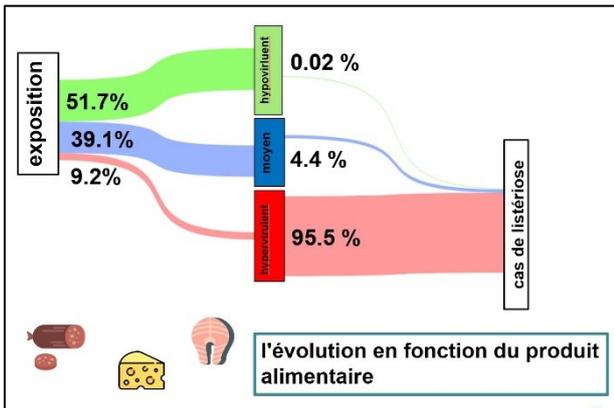


Fig. 19 : Taux d'exposition et virulence dans les cas de listériose, varie en fonction de la denrée alimentaire

Le WGS offre donc des opportunités prometteuses mais d'une utilité limitée en soi sans contexte biologique et de santé publique.

Les avantages de la méthode sont :

- résultats rapides,
- faibles coûts d'exploitation,
- bonne répétabilité,
- résultats robustes et fiables,

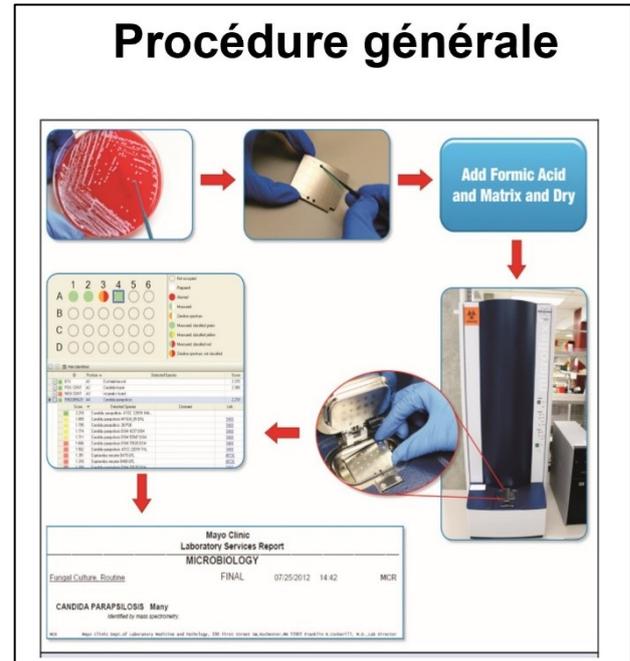


Fig. 20 : Procédure pour l'analyse MALDI-TOF

critiques sont :

- le volume d'échantillon,
- les coûts initiaux,
- l'extension régulière de la bibliothèque de spectres de référence.

5. Potentiel du MALDI-TOF

Alicia Romanó (Agroscope) a parlé du "Potentiel du MALDI-TOF" dans sa présentation. MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight) est une méthode d'ionisation des molécules et d'analyse spectrométrique de masse. Cette technique n'est pas nouvelle et les premières données sur les études bactériologiques ont été présentées il y a plusieurs années. Cependant, les développements ultérieurs ont fait de cette technique un outil précieux, comme en témoigne, par exemple, le nombre de publications. Il existe actuellement plus de 100 publications avec les mots-clés "MALDI-TOF" et "santé publique".

Lors de l'analyse des échantillons, une petite quantité d'une colonie pure est appliquée sur la cible, mélangée à une matrice spéciale, séchée et chauffée précisément et vaporisée au laser. Il est important de faire attention à la quantité d'échantillon (Bastin, 2018). Le procédé MALDI transforme les protéines et les peptides de microorganismes isolés en ions chargés positivement. Ceci est réalisé par un laser UV. La matrice absorbe l'énergie du laser et transfère les protons aux protéines intactes en phase gazeuse. Les ions sont ensuite accélérés électroniquement et atteignent le tube volant à une vitesse dépendant de la masse. Comme les différentes protéines et peptides ont des masses différentes, les ions atteignent le détecteur à des moments différents (= temps de vol, temps de vol TOF). L'appareil mesure le temps entre l'accélération pulsée et le signal du détecteur correspondant des ions, puis le temps est converti en masses moléculaires précises. Les spectres caractéristiques (empreinte protéomique) sont comparés aux spectres de référence (figures 20 et 21).

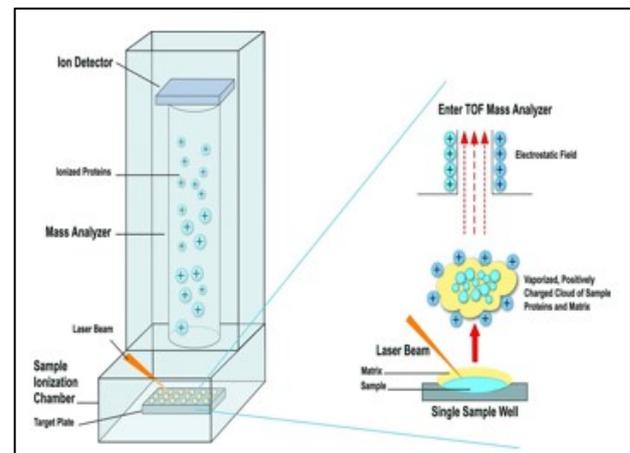


Fig. 21 : Fonctionnalité du MALDI-TOF dans l'investigation des maladies infectieuses (Patel, 2015)

La spectrométrie de masse MALDI-TOF est utilisée chez Agroscope pour l'identification des bactéries lactiques et des levures, ainsi que pour des expériences visant à différencier des souches dans des cultures de départ, par exemple *Streptococcus thermophilus*.

Alicia Romanó utilise également cette méthode dans sa thèse. L'objectif de la recherche est de déterminer s'il existe un lien entre le résistome présent dans la glande mammaire et les bactéries isolées par des échantillons environnementaux. Le résistome intramammaire est lié à l'environnement (litière, manchon, surface du trayon), voir aussi figure 22.

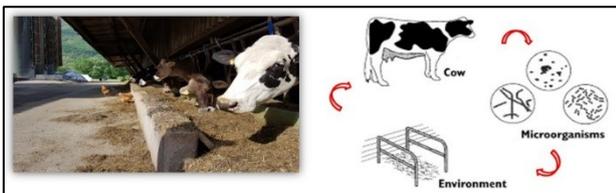


Fig. 22 : Relation entre le résistome intramammaire et son environnement (litière, manchon, surface du trayon)

Pour plus de 1600 échantillons, l'utilisation de MALDI-TOF est le moyen le plus simple et le plus rapide d'identifier les espèces contenues dans les échantillons. Les échantillons sont cultivés sur sang ou gélose sélective et les cultures pures sont identifiées avec MALDI-TOF. Jusqu'à présent, 1 484 souches différentes appartenant à 102 espèces différentes ont pu être déterminées à partir de 1 200 échantillons, dont 64 % étaient des *Staphylococcus* sous-espèces.

D'autres exemples de l'utilisation réussie du MALDI-TOF peuvent être trouvés dans la littérature :

- Analyse de l'eau d'échantillons environnementaux pour confirmer la présence de *Legionella*,
- microbiologie pharmaceutique,
- la recherche taxonomique,
- microbiologie alimentaire (analyse de confirmation des résultats positifs de bactéries, *Cronobacter*, *Salmonella* spp.)
- bactériologie vétérinaire (mammites pathogènes, espèces inhabituelles),
- Sous-typage de germes résistants aux antibiotiques tels que les entérobactéries productrices de KPC ou le MRSA dans le *Staph. aureus*.

Bibliographie

- Anonymous. 1986. Salmonellenepidemie bedingt durch Weichkäse. Bulletin des Bundesamtes für Gesundheitswesen, 8, 48 - 49
- Anonymous. 1988. Zur Listeriose-Situation in der Schweiz. Bulletin des Bundesamtes für Gesundheitswesen, 3, 28-29
- Anonymous. 2008. MQ-Fromarte, Berne
- Anonymous. 2016a. Use of wood in cheese ripening. IDF Factsheet, November 2016, 2 pp
- Anonymous. 2016b. European Guide for Good Hygiene Practices in the production of artisanal cheese and dairy products - Target: Farmhouse and Artisan producers. Revised version of 20th December 2016, 98 pp
- Anonymous. 2017. Listeria monocytogenes und der Konsum von Milch und Milchprodukten während der Schwangerschaft – Empfehlungen und Hintergrundinformationen. Bundesamt für Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen BLV, 3. Fassung, Juli 2017, 7 pp
- Bachmann H.P., Spahr U. 1995. The Fate of Potentially Pathogenic Bacteria in Swiss Hard and Semihard Cheeses Made from Raw Milk. J. Dairy Sci., 78, 476-483
- Bastin B., Bird P., Benzinger Jr M.J., Crowley E., Agin J., Goins D., Sohler D., Timke M., Shi G., Kostrzewa M. 2018. Confirmation and Identification of Salmonella spp., Cronobacter spp., and Other Gram-Negative Organisms by the Bruker MALDI Biotyper Method: Collaborative Study, First Action 2017.09. Journal AOAC Int., 101, 5, 1593-1609
- Becker H., Berger T., Eliskases-Lechner F., Jakob E., Knödseder M., Märtlbauer E., Westermair T., Zangerl P. InterLab Leitfaden: Listerien in Milchprodukten: FOOD-Lab, 1, 34-38, 2017
- Büla C.J., Bille J., Glauser M.P. 1995. An Epidemic of Food-Borne Listeriosis in Western Switzerland: Description of 57 Cases Involving Adults. Clin. Infect. Dis., 20, 66-72
- Imhof R. 2014. Prävalenz von pathogenen Keimen in Rohmilch und im Teig von Rohmilchkäsen. Präsentation: Beratertagung, 08. Dezember 2014
- Imhof R., Riva Scettrini R. 2015. Einfache Dampfzelle für die Hitzebehandlung von Käsebrettern, Agroscope Technik, April 2015, 8pp
- Imhof R., Schwendimann L., Riva Scettrini P. 2017. Sanitising wooden boards used for cheese maturation by means of a steam-mediated heating process. J. Consum. Prot. Food Saf., 12, 255–263
- InterLab. 2018. InterLab Leitfaden zu Listerien in Milchprodukten. Version 1, 16pp, Juni 2018
- Jackson B.R., Tarr C., Strain E., Jackson K.A., Conrad A., Carleton H., Katz L.S., Stroika S., Gould L.H., Mody R.K., Silk B.J., Beal J., Chen Y., Timme R., Doyle M., Fields A., Wise M., Tillman G., Defibaugh-Chavez S., Kucerova Z., Sabol A., Roache K., Trees E., Simmons M., Wasilenko J., Kubota K., Pouseele H., Klimke W., Besser J., Brown E., Allard M., Gerner-Smidt P. 2016. Clin. Infect. Diseases, 63, 3, 380–386
- Jakob E. Menéndez González S. 2015. Leitlinie für die gute Verfahrenspraxis bei der Milchgewinnung und -verarbeitung in Sömmerungsbetrieben. Schweizerischer Alpwirtschaftlicher Verband SAV und Schweizer Alpkäse c/o Schweizer Milchproduzenten SMP, Bern
- Kuousta M. et al. 2010. European Dairy Magazine, No. 2
- Lutz A. 2010. Auswertung der Nationalen Untersuchungsprogramme in der EU, Community Summary Report 2008 der EFSA, Bundesamt für Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen BLV
- ODAIOUs. 2019. Ordonnance sur les denrées alimentaires et les objets usuels (ODAIIOUs), 817.02, du 16 décembre 2016 (Etat le 15 octobre 2019)
- OHyg. 2018. Ordonnance du DFI sur l'hygiène dans les activités liées aux denrées alimentaires (Ordonnance du DFI sur l'hygiène, OHyg), 817.024.1, du 16 décembre 2016 (Etat le 30 octobre 2018)
- Patel R. 2015. MALDI-TOF MS for the Diagnosis of Infectious Diseases.
- Pightling A.W., Pettengill J.B., Luo Y., Baugher J.D., Rand H., Strain E. 2018. Interpreting Whole-Genome Sequence Analyses of Foodborne Bacteria for Regulatory Applications and Outbreak Investigations. Front. Microbiol., 9, 482, 13pp
- Règlement (CE) No 852/2004 DU PARLEMENT EUROPÉEN ET DU CONSEIL du 29 avril 2004 relatif à l'hygiène des denrées alimentaires (JO L 139 du 30.4.2004, p. 1), version consolidée du 31.3. 2009.
- Sörqvist S. 2003. Heat resistance in liquids of *Enterococcus* spp., *Listeria* spp., *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp. Acta Vet. Scand. 44, 1–2, 1–19