

1^{er}-4 août 1999, Bearborn - USA

L'IAMFES a désormais changé de nom pour devenir "l'International Association for Food Protection" ou IAFP

Rédaction : Marielle GAY

Date : 13/09/1999

Pour tout complément d'information, contactez Muriel COIGNARD (m.coignard@asept.fr)

Dimanche 1er Août : Session d'ouverture

Lecture "Ivan Parkin" : Sécurité alimentaire au 21ème siècle

F.K. Käferstein, FDA/USDA

Le contrôle des aliments reste un problème pour les pays développés en surtout pour les pays en voie de développement (PVD). Dans cette intervention, seuls les PVD d'Amérique du Sud sont pris en compte.

Depuis 20 ans, une prise de conscience de la sécurité alimentaire a été observée. Cependant, les maladies liées à la contamination des aliments est peut-être le problème le plus important des PVD. En 1999, 1 800 000 décès ont fait suite à des diarrhées infantiles chez des enfants âgés de moins de 5 ans. En 1989, environ 5 millions de décès avaient été dénombrés.

Les problèmes actuels :

- Industrialisation de la production des aliments et de la production animale
- augmentation de la DLC des aliments, liée à l'urbanisation
- pauvreté : entre 1/5 et 1/4 de la population mondiale
- dangers liés à l'environnement :
 - diminution des réserves en eau
 - réchauffement global de la planète
 - pollution par des produits chimiques toxiques
- voyages internationaux qui favorisent l'entrée d'aliments et de pathogènes "exotiques"
- microorganismes alimentaires pathogènes :
 - *E.coli* entéro-hémorragique
 - *Campylobacter*
 - *L.monocytogenes*
 - *Vibrio cholerae* O139
 - *Mycobacterium* spp. et *Mycobacterium paratuberculosis*
- distribution de masse engendre des épidémies de grande importance
- fabrication : contrôle des températures et de la durée : aussi bien pour les traitements thermiques (barèmes insuffisants) que pour la conservation (température trop élevée et durée trop longue)
- pratiques de fabrications : pas toujours de Bonnes Pratiques Hygiéniques de Fabrication.

Les progrès à réaliser pour le 21ème siècle :

- Développement des OGM : plantes et animaux (gènes de résistance à certains pathogènes)
- développement de méthodes rapides de détection des pathogènes dans les aliments
- développement des traitements assainissants pour les aliments : ionisation par exemple
- développement de nouvelles technologies par l'utilisation de nouvelles énergies : par exemple, développement de l'énergie solaire car il existe un problème de coût de certaines énergies pour les PVD
- Amélioration de l'information sur les nouvelles technologies

Les challenges pour le futur :

- Développement des systèmes de surveillance des maladies d'origine alimentaire
- Développement des systèmes de contrôle de la production alimentaire : HACCP, par exemple
- Utilisation, par les laboratoires de contrôle des aliments, de méthodes rapides de détection des pathogènes
- Développement de l'analyse des risques
- Information et éducation du consommateur

Conclusion : La sécurité alimentaire est un élément essentiel de la santé publique.

Citation de Willy Brandt, Prix Nobel : "La paix n'est pas tout, mais sans paix tout est rien".

Citation de F.K. Käferstein : "La sécurité alimentaire n'est pas tout, mais sans sécurité alimentaire tout est rien".

Lundi 2 Août : Session 1 : Critères scientifiques pour l'harmonisation des réglementations sur la sécurité alimentaires

1. Harmonisation des limites de tolérance pour *Listeria monocytogenes* : l'expérience européenne

Paul Teufel, Institut pour l'hygiène et la sécurité alimentaire - Kiel, Allemagne

La réglementation actuelle est la suivante : Absence de *Listeria monocytogenes* dans 25 g d'aliment avec une tolérance : $<10^2/g$ à la DLC sur certains produits.

Utilisation d'une approche quantitative du risque :

Analyse du risque *Listeria monocytogenes* lié à la consommation de poisson fumé

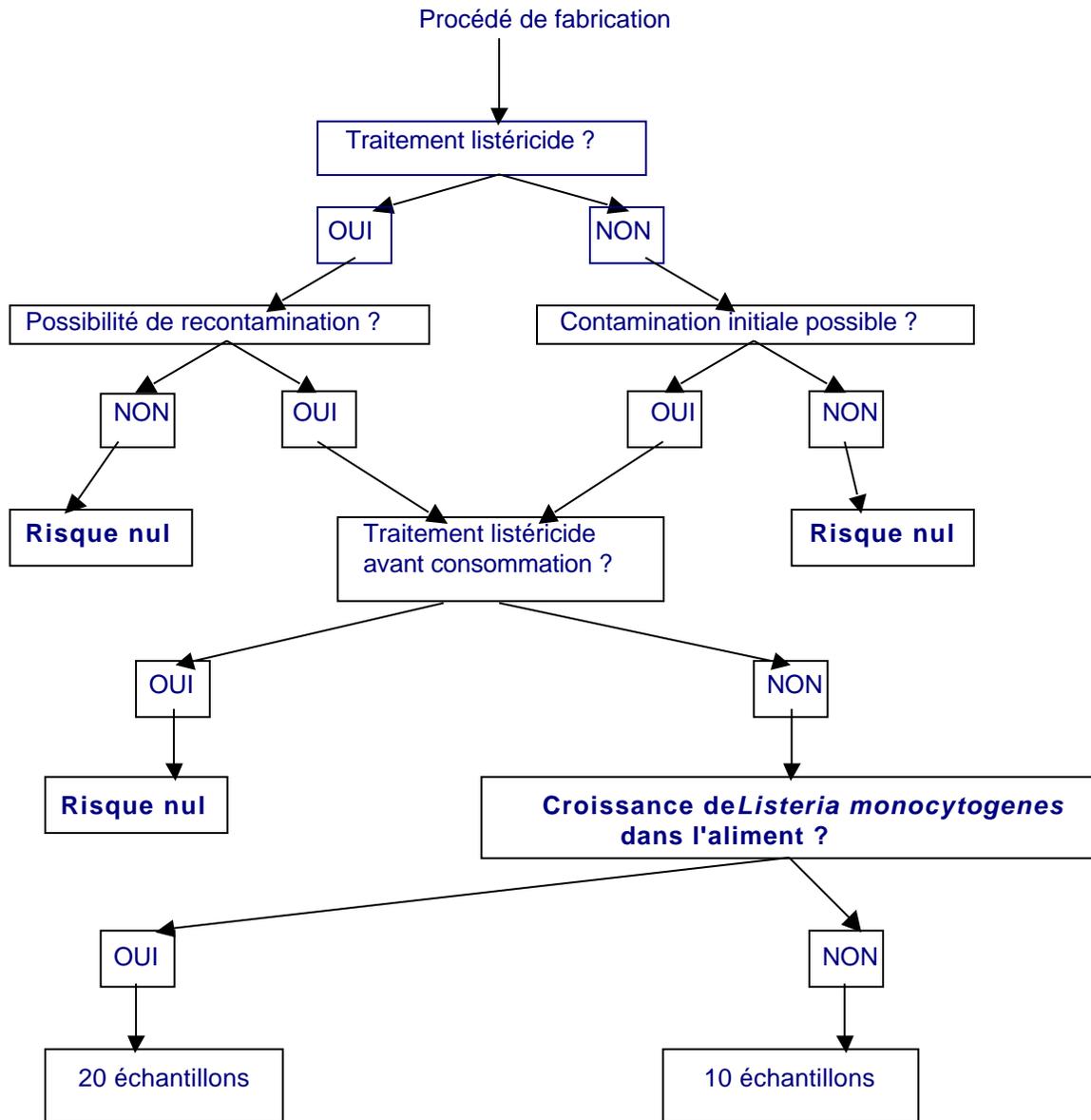
- actuellement moins de 200 cas par an en Allemagne
- 20 % de la population est considérée à risque : environ 3 % de la population à risque mange du poisson fumé.

Estimation du risque sur la population à risque mangeant du poisson fumé (0,6 % de la population totale) :

- risque de cas pour une personne par an : 1/82 000
- risque de cas par portion (présence de *Listeria monocytogenes*) : 1/154 000
- risque de cas par portion (si plus de 10^4 *Listeria monocytogenes/g*) : 1/17 000

Arbre de décision ci-après permettant de déterminer :

- le plan d'échantillonnage pour un aliment
- l'acceptation ou le refus d'un aliment



Rejet d'un lot :

- pour les produits pour lesquels 10 échantillons sont nécessaires : si un échantillon présente un dénombrement supérieur à 10^2 *Listeria monocytogenes*/g, le lot est rejeté.
- Pour les produits pour lesquels 20 échantillons sont nécessaires : si un échantillon présente un dénombrement supérieur à 10 *Listeria monocytogenes*/g, le lot est rejeté.

2. Harmonisation des critères d'acceptation des méthodes microbiologiques alternatives Russel S. Flowers, Silliker Laboratories Group- Chicago, USA

Actuellement, il n'existe pas de comparaison inter-laboratoires au niveau international. Les différentes organisations impliquées dans la validation de méthodes alternatives sont :

- l'ISO
- l'IDF : Fédération Laitière Internationale (International Dairy Federation)
- l'AOAC
- le CEN

Un problème important se pose entre ces différentes organisations : la validation faite par l'une de ces organisations n'est pas automatiquement reconnue par les autres. En effet, les méthodes de références utilisées ne sont pas les mêmes, et les protocoles réalisés pour tester les méthodes alternatives sont différents.

A titre d'exemple, pour qu'une méthode alternative soit reconnue au niveau international, il faut qu'elle soit validée par les organisations suivantes :

- AOAC
- AFNOR
- NMKL
- Australian Standards Association (Equivalent de l'AFNOR pour l'Australie)
- Microval-CEN (Niveau européen)

Cette validation par 5 organisations différentes représente un coût très important.

Actuellement, il semble indispensable qu'une harmonisation entre les différentes organisations de validation soit réalisée. Cependant cette harmonisation pose deux problèmes principaux :

- les méthodes de référence : actuellement il existe deux types de méthodes de référence : les méthodes ISO (International Standard Organisation) et les méthodes AOAC.
- les protocoles de validation bien que relativement proches d'une organisation à une autre ne sont pas mutuellement reconnus. Dans l'ensemble le schéma général de validation est le même :
 - Etude comparative et étude collaborative,
 - Compétence des laboratoires qui pratiquent les essais,
 - Méthodes d'évaluation des performances d'une méthode alternative sont à peu près les mêmes dans les différentes organisations.

Actuellement, Microval (en Europe) et l'AOAC (aux Etats-Unis) commencent à travailler en commun. Dans le protocole de validation de Microval, au moins 8 laboratoires doivent être impliqués et les échantillons doivent être naturellement contaminés. Pour l'AOAC, au moins 15 laboratoires doivent réaliser des essais. Il n'y a pas de précision sur la nature de la contamination des échantillons.

Actuellement, le problème majeur qui se pose est qu'il n'y a pas de comparaison entre les méthodes de référence utilisées par Microval (ISO ou CEN) et par l'AOAC (AOAC ou BAM).

Actuellement, l'ISO (ISO-TC 34-SC 9) donne des possibilités de comparer les méthodes de référence ISO et AOAC. Au niveau européen (CEN TC 275-WG 6-TAG 2) des personnes de l'AOAC en font partie.

Conclusion :

- Des efforts doivent être faits afin de comparer les méthodes ISO et les méthodes AOAC.
- Un protocole de validation commun (ISO-AOAC) peut être développé
- l'ISO et le CEN font de réels efforts pour accepter les données obtenues selon d'autres protocoles de validation.

Lundi 2 Août : Session 2 : Fruits et légumes : sont-ils encore sains ?

1. Epidémies associées aux produits végétaux aux USA Arthur P. Liang, CDC - Atlanta, USA

En moyenne, entre 1974 et 1998, moins de 10 % des épidémies sont reliés à des produits végétaux (fruits ou légumes), mais en 1988, 1990, 1992, 1994 et 1996 entre 20 et 25 % des épidémies ont été reliés à des végétaux.

Entre 1973 et 1987, 242 cas par an ont été observés. Aucun décès n'a été déclaré. Entre 1988 et 1991, 614 cas par an ont été observés et 6 décès ont été enregistrés.

Le tableau suivant présente la part de divers agents responsables d'épidémies

Agents responsables	de 1973 à 1987	de 1988 à 1998
Bactéries	37,5 %	50 %
Virus	1,9 %	7,1 %
Parasites	8,1 %	12 %
Inconnus	55 %	37 %

Le tableau suivant présente la part de diverses bactéries dans les épidémies liées à la consommation de produits végétaux.

Genre bactérien	Pourcentage entre 1988 et 1998
<i>Salmonella</i>	26 %
<i>E.coli</i> O157:H7	22 %
<i>Shigella</i>	3 %
<i>Bacillus cereus</i>	1 %
Autres	48 %

Dans le Minnesota, entre 1982 et 1989, 1049 épidémies ont été dénombrées. 354 sont des salmonellose, 18 sont dues à *E.coli*. L'origine des germes est déterminée par utilisation des techniques PCR. Les résultats montrent que 25 % des épidémies sont reliées à la consommation de légumes frais.

Origine des produits : 75,3 % des cas sont reliés à des produits consommés à la maison. Entre 1990 et 1998, 20 % des cas sont liés à la consommation de fruits, 18,7 % à la consommation de laitue et 35,4 % à la consommation de salade en restauration rapide (bar).

Conclusion sur les épidémies après 1987 :

- Le nombre d'épidémies et le nombre de cas a plus que doublé par rapport aux années précédentes.
- Une large variété de produits a été mise en cause dans les différentes épidémies.
- La majorité des épidémies sont liées à la présence de bactéries : principalement *Salmonella*.
- Un nouvel agent pathogène fait son apparition dans les produits végétaux : *E.coli* O157:H7
- "Les épidémies déclarées et reconnues ne sont que le sommet de l'iceberg."
- Augmentation du nombre de cas de salmonellose : de 10 cas pour 100 000 habitants en 1960 à 15 à 20 cas pour 100 000 habitants en 1990.
- La santé publique est ce que fait la société pour assurer les conditions permettant aux personnes d'être en bonne santé.

Bien que le système de surveillance des épidémies soit plus performant et qu'une augmentation de la consommation de fruits et légumes soit observée, il y a réellement une augmentation du nombre de cas de contamination par l'intermédiaire des produits végétaux.

Lundi 2 Août : Session 3 : Mini Atelier pour les industriels de l'industrie laitière et la réglementation

1. Conception hygiénique et installation des équipements - Don Graham, Graham Sanitary Design Consulting - Chesterfield, USA

Cet exposé présente les principes de base de la conception hygiénique des locaux, des équipements et de l'installation des équipements dans les locaux. Le système HACCP permet de déterminer et de maîtriser les dangers physiques, chimiques et microbiologiques liés à une ligne de production. Les vecteurs de contamination des produits sont principalement le personnel, l'environnement (locaux et flux d'air) et le procédé de fabrication (équipements et flux de matière).

Les équipements

Les cuves et autres équipements de stockage des produits doivent être fermés. Tous les équipements doivent être accessibles afin de permettre un bon nettoyage.

Caractéristiques des surfaces en contact avec les aliments :

- Non réactives : éviter les dangers chimiques
- Non contaminantes : éviter les dangers microbiologiques
- Résistantes à la corrosion
- Non absorbantes
- Nettoyables

Les organismes publiant des recommandations

- 3A et E3A : normes sur l'hygiène et pratiques industrielles
- BISSC : pour l'industrie boulangère
- NSF

Installations des équipements

- Eviter les angles à 90° qui ne sont pas nettoyables.
- Pour limiter la formation de biofilms (sur tapis convoyeur et autres surfaces), l'état de surface des matériaux doit être correct : éliminer toutes les surfaces usées.

Conception des équipements :

- Penser à la nettoyabilité de l'équipement : accessibilité, fermer toutes les extrémités pour éviter l'accumulation de matière organique.
- Fixation de l'équipement au sol : ne pas faire d'angle droit entre les pieds de l'équipement et le sol.
- Faire des angles à environ 45°, pour permettre un bon nettoyage.
- Pour les cuves : ne pas réaliser une fermeture horizontale
- Les moteurs, pompes et vannes ne doivent pas être positionnés trop près des surfaces en contact avec les aliments.
- Robinets : éviter les zones mortes
- Nettoyage des tapis convoyeur : prélavage, nettoyage (et désinfection) à la mousse, rinçage
- Système d'évacuation des cuves : ne pas utiliser des cuves à fond plat
- Installations de tuyaux : éliminer les bras morts, par exemple pour le passage d'une porte ou d'une fenêtre.

Les locaux

- Les systèmes d'aération sont fortement suspectés d'être vecteurs de certains pathogènes. Les manches à air doivent être arrondies et pas carrées.
- Les murs et les sols : utilisation de panneaux sandwich et de surfaces nettoyables.
- Evacuation des eaux usées : prévoir une installation permettant de récolter les déchets organiques.

Lundi 2 Août : Session 4 : Les maladies alimentaires dans le monde

1. Les maladies alimentaires dans les pays en voie de développement Ewen Todd, Health Canada - Ottawa, Canada

Salmonella

Bolivie : Contamination d'eau par *Salmonella* et *E.coli* : responsable de diarrhée

Singapour : une étude sur la contamination des fruits et légumes montre que la noix de coco est contaminée par *Salmonella* (17 %) et *E.coli* (4 %)

Thaïlande : le poulet est contaminé par des souches de *Salmonella* résistantes aux antibiotiques. En 1994, 22 % des produits sont contaminés par *S.enteritidis* contre seulement 6 % en 1993.

Jordanie : 70 % des oiseaux sont infectés par *S.gallinarum*, *S.enteritidis* et *S.paraheamolyticus*. La contamination se situe dans l'eau. Les terres irriguées sont 100 fois plus contaminées par les entérobactéries que les terres non irriguées.

E.coli

Australien aborigènes : VTEC : *E.coli* (pas O 157) responsable de diarrhée chez les enfants

Arabie Saoudite : Des militaires américains et anglais ont été victimes de ETEC : O159

Egypte : En 1997, infection avec *E.coli* O157:H7. 6% du lait cru et 6 % de la viande de bœuf fraîche (chez le détaillant) sont contaminés par *E.coli* O157:H7.

Cameroun : En 1997, 237 cas d'infection liés à *E.coli* O157:H7, et 44 décès

Clostridium botulinum :

Egypte : cas de botulisme lié à la consommation de poisson

Choléra

Afrique : Epidémies de Choléra liées à :

- sauces à base de cacahouète
- des restes de crabes
- farine de seigle

Mozambique : en 1997 : plus de 30 000 cas d'intoxication alimentaire avec 780 décès.

A Hong-Kong : 34 cas de choléra en 1998 liés à la consommation de produits de la mer et d'œufs crus.

Produits alimentaires des vendeurs de rue :

Mexique : les produits alimentaires vendus dans la rue sont responsables de 60 000 décès par an.

Zambie : Les viandes sont contaminées par *Salmonella*, *S.aureus* et *B.cereus*

New-York : 40 % des aliments vendus dans la rue sont dangereux pour la santé des consommateurs.

Les causes de ces contaminations :

- Effet du tourisme : infection par les aliments vendus dans la rue, et la diarrhée des voyageurs ("la turista").
- Les pathogènes impliqués : principalement *Salmonella* et *E.coli*.
- Les problèmes de l'agriculture : irrigation avec une eau contaminée et utilisation d'antibiotiques en élevage.
- Les modes de consommation : pauvreté, vente dans la rue, impact culturel, contamination de l'eau utilisée pour le lavage des fruits et légumes et comme boisson, augmentation de la population de réfugiés (conditions de vie précaires), augmentation de la population immunodéprimée (notamment les patients atteints du sida).
- Les échanges commerciaux : augmentation des échanges internationaux, différenciation de l'alimentation qui augmente le danger microbiologique à cause d'un manque de connaissance sur certains aliments.
- Les changements climatiques (réchauffement de la planète) qui entraînent des modifications de l'environnement.

- Migration de population vers les villes.

2. Les maladies alimentaires en Amérique du Nord Ellen Morrison, FDA - Washington, USA

Les facteurs impliqués dans l'apparition des maladies alimentaires :

- la démographie : augmentation de la part de la population âgée,
- le devenir de l'homme : augmentation de la population à risque, mode de consommation,
- les changements industriels et technologiques : création de nouveaux produits et apparition de nouveaux dangers,
- les modifications des échanges internationaux : augmentation des échanges et diversité des produits alimentaires d'origines diverses,
- l'augmentation du nombre de touristes : source de contamination (à leur arrivée et au retour dans leur pays), sensibilité plus grande que les populations locales,
- l'adaptation des micro-organismes : notamment acquisition d'une résistance aux antibiotiques et agents antimicrobiens,
- le développement économique et l'utilisation des terres agricoles.

Les facteurs contribuant à la détection des maladies alimentaires :

- amélioration des systèmes de surveillance,
- amélioration et développement de technique de laboratoire : méthodes rapides de détection et caractérisation moléculaire des pathogènes.

Problèmes reliés aux maladies alimentaires :

- *Cyclospora cayentanensis* : 1996-1997 au Canada. Contamination liée à la consommation de framboises. Afin de déterminer l'origine de la contamination, une coopération et une coordination, sur plusieurs années, entre plusieurs états et plusieurs pays. Le gouvernement canadien a travaillé avec les autorités du Guatemala (pays exportateur) afin de déterminer la cause de la contamination.
- *Shigella sonnei* - 1998 aux USA. Contamination liée à la consommation de persil. Travail de collaboration entre le gouvernement américain (CDC) et les autorités du Mexique (pays exportateur). Etude d'investigation dans des fermes au Mexique, étude des facteurs environnementaux dans la contamination. Le principal problème pour trouver la source de la contamination est que ce type d'aliment est consommé en moyenne 2 mois après avoir été récolté. Il est donc nécessaire de faire un suivi régulier des fermes de production afin de connaître les conditions générales d'hygiène.
- *Salmonella* Typhimurium - 1998. Contamination liée à la consommation de choux. Coordination et collaboration entre les différents états et les autorités. Vérification de l'intégrité des lots de plantation, détermination des voies de contamination des plantations domestiques.

Actions réglementaires liées aux épidémies

- Retrait des lots de produit impliqué
- Augmentation des contrôles des aliments importés
- Saisie des aliments contaminés
- Arrêt des importations des aliments contaminés

Problèmes internationaux :

- Des produits alimentaires des USA impliqués dans des épidémies dans des pays étrangers
- Traçabilité des fruits et légumes
- Travail avec les industriels pour améliorer la traçabilité des produits et du procédé
- Investigation dans les fermes
- Implication internationale

Les buts et initiatives de la FDA :

- Améliorer la collaboration et la coopération entre les pays dans le cas d'épidémies qui concernent plusieurs pays.
- Améliorer la traçabilité sur les fruits et les légumes : développer des procédures et travailler avec les producteurs et les industriels.
- Développer de nouveaux procédés de transformation pour améliorer la qualité sanitaire des aliments.

3. Les maladies alimentaires en Europe **Ewen Todd, Health Canada - Ottawa, Canada**

Les problèmes actuels en Europe ne sont pas des problèmes microbiologiques :

- Guerre d'échanges avec les USA et le Canada : à propos de la viande aux hormones
- Problèmes de la dioxine
- Problèmes de la firme Coca-Cola

Les différentes épidémies :

- 1964 : Ecosse : Contamination de viande de bœuf par *Salmonella typhi* : 507 cas et 3 décès.
- 1966 : Italie : Contamination de fromages par *C.botulinum*
- 1977 : Suède : contamination par *Salmonella enteritidis* dans une cantine d'école.
- 1978 : Angleterre : Contamination de conserves de saumon d'Alaska par *C.botulinum* : 4 cas et 2 décès.
- 1992 : Belgique : Contamination de conserves de saumon d'Alaska par *C.botulinum* : 2 cas et 1 décès.
France : Contamination de rillettes par *L.monocytogenes*.
- 1993 : Danemark : Contamination de la viande de porc par *Salmonella infantis* : plus de 500 cas. Il a été montré une contamination croisée sur le procédé : contamination lors de l'éviscération.
- 1995 : Italie : Contamination de salami par *Salmonella*. Depuis 1988, on observe une contamination régulière des œufs par *Salmonella enteritidis*.

Cas d'ETEC aux USA avec du fromage de type Brie ou Camembert importé de France. En France, la fabrication de fromages au lait cru est liée à un environnement culturel et social et a un intérêt économique pour le pays.

Shigella : Contamination de laitue. L'utilisation de la PCR et l'étude des profils d'ADN permet une meilleure traçabilité que le typage par phage.

Les problèmes microbiologiques actuels :

- *Salmonella*
- *L.monocytogenes*
- *Trichinosis* : viande de cheval
- Fromages au lait cru contenant potentiellement des germes pathogènes

Les nouveaux pathogènes :

- *E.coli* O157
- *Vibrio* CJD
- Augmentation du nombre de germes résistants aux antibiotiques
- Augmentation de la population âgée et de la population à risque
- Immigration importante

Leçon des épidémies passées :

- travail à réaliser sur l'analyse des risques
- Les gouvernements des différents pays travaillent en commun.

Lundi 2 Août : Session technique : Microbiologie alimentaire générale

T15. Activité des bactériophages contre *E.coli* O157:H7 et *Salmonella* Ananta P. Dessai, Université de Tuskegee - Tuskegee, USA

Résumé de l'auteur : Contrôler les pathogènes alimentaires est de la plus grande importance pour assurer la sécurité de nos aliments. Ces dernières années, l'émergence et la réémergence de formes virulentes des pathogènes alimentaires dont *Salmonella* spp. et *E.coli* O157:H7 a augmenté le besoin de développer des systèmes barrières efficaces ; d'utiliser de nouvelles méthodes biologiques et physico-chimiques. Les agents antimicrobiens naturels ont un avantage unique par rapport à de nombreux autres agents antimicrobiens : ils présentent un faible niveau de toxicité pour l'homme. Parmi les agents antimicrobiens naturels, les bactériophages ont la capacité de lyser rapidement les cellules bactériennes. De plus, les phages survivent mieux que les bactéries dans des conditions environnementales difficiles. Ils peuvent donc être utilisés dans un système de protection barrière. Dans cette étude, des échantillons d'eaux usées sont filtrés (sur des membranes de 0,22 µm), mis en contact avec *E.coli* O157:H7 et incubés. Une observation en microscopie électronique des bactériophages isolés montrent que les bactériophages STU3, ETU1 et ETU2 sont structurellement différents. ETU 1 et ETU 2 sont virulents contre *E.coli* O157:H7 et STU3 est actif contre *E.coli* O157:H7 et *Salmonella* spp. La virulence de ces bactériophages est testée sur de nombreuses autres souches de *E.coli* O157:H7 et *Salmonella*. Actuellement, l'utilisation des phages dans le contrôle des pathogènes en industrie alimentaire est étudiée.

Résumé des notes prises lors de l'intervention :

Cette étude a pour but de déterminer s'il est envisageable d'utiliser des bactériophages dans les systèmes barrière.

Introduction : Caractéristiques des bactériophages :

- haute spécificité
- multiplication : auto-multiplication et auto-limitation
- possibilités de manipulations génétiques
- utilisation possible dans les systèmes barrière

Matériel et méthode :

- échantillons d'eaux usées
- isolement des phages de *Salmonella* spp. et de *E.coli* O157:H7
- culture en utilisant la méthode sur agar en double couche
- utilisation de plaque de purification
- détermination de l'activité des bactériophages sur différents pathogènes alimentaires dont *E.coli* O157:H7 et *Salmonella* spp.

Résultats :

- Trois phages ont été isolés (ETU 1, ETU 2 et STU 3).
- Le phage isolé à partir de *Salmonella* spp. (STU 3) présente une activité sur la plupart des autres souches de *Salmonella* spp. testées, sur *E.coli* O157:H7 mais n'est pas actif contre les autres *E.coli* et contre *Shigella*.
- Deux phages ont été isolés à partir de *E.coli* O157:H7 (ETU 1 et ETU2). Ces phages ne présentent pas d'activité contre *Salmonella* spp., mais sont actifs sur *Shigella*.

Conclusion :

- Les phages isolés dans cette étude présentent un intérêt certain dans la maîtrise de *Salmonella*, *E.coli* et *Shigella*.
- Il faut maintenant déterminer quelles sont les possibilités d'utiliser ces phages en industrie alimentaire pour limiter la contamination des aliments par ces pathogènes.

T22. Rôle de la membrane cytoplasmique dans la résistance thermique chez *Pediococcus* sp.

Bassam A. Annous, USDA - Wyndmoor, USA

Résumé de l'auteur : *Pediococcus* sp. est un microorganisme non pathogène résistant à la chaleur qui a été utilisé comme microorganisme test dans les études de pasteurisation du lait. Les résultats obtenus montrent que la résistance à la chaleur de ce microorganisme dépend des conditions de croissance. Les objectifs de cette étude sont de déterminer :

- l'effet des conditions de croissance sur la composition en acides gras de la membrane.
- le rôle de la membrane plasmique dans la thermorésistance de *Pediococcus* sp.

La composition lipidique de la membrane et la thermorésistance (valeur de D) de *Pediococcus* sp. sont déterminées sur des cellules prélevées en milieu de la phase exponentielle de croissance et en phase stationnaire. Les cultures sont réalisées en bouillon tryptone soja et en bouillon tryptone, glucose additionné d'extrait de levure, l'incubation est réalisée à 28°C et 37°C. Les conditions de croissance influencent de manière importante la fluidité de la membrane à cause de changements importants de la composition en lipides de la membrane. Une augmentation de la fluidité de la membrane à cause des changements de conditions de croissance correspond à une diminution des valeurs de D pour ce microorganisme. La chaleur provoque une déstabilisation de la membrane cytoplasmique, permettant la pénétration d'acides nucléiques colorés par une fluorescence rouge. Les résultats de cette étude suggèrent que la membrane cytoplasmique de *Pediococcus* sp. joue un rôle critique dans la thermorésistance. Les travaux se poursuivent pour étudier l'effet de l'inactivation thermique sur l'ARN ribosomal de *Pediococcus* sp.

Résumé des notes prises : Deux milieux de croissance sont utilisés (avec et sans glucose). La température de croissance et la composition du milieu de culture ont un effet sur la valeur de D. La composition de la membrane en acide gras est différente selon la température de croissance et la nature du milieu. Il existe une relation entre la composition en acide gras de la membrane et les valeurs de D.

NB : Lors de la détermination des valeurs de D pour un microorganisme, il faut tenir compte de la composition du milieu culture.

T23. Résistance aux antibiotiques des bactéries "entériques" Gram négatif isolées de la viande

Robert L. Sudler, University of Maryland College Park - College Park, USA

Résumé de l'auteur : L'objectif de cette étude est de déterminer la résistance aux antibiotiques de *Salmonella* spp. et *E.coli* isolés dans de la viande. 200 échantillons de viande (dont de la viande de bœuf, de poulet, de porc et de dinde) ont été prélevés chez des distributeurs. Les germes sont isolés selon les méthodes décrites par la FDA. La résistance aux antibiotiques est déterminée par l'utilisation de disques de la société Difco (Dispens-O-disk susceptibility test system). Sur 330 isolats de *E.coli*, 169 (51 %) sont résistants à au moins un antibiotique. La tétracycline est l'antibiotique pour lequel *E.coli* est le plus résistant (35%). La résistance multiple la plus rencontrée (7 % des isolats) est streptomycine-sulfoxazole-tétracycline. Sur 364 isolats de *Salmonella*, 217 (60 %) sont résistants à au moins un antibiotique. 58 % des souches de *Salmonella* sont résistantes à la tétracycline. La résistance multiple la plus rencontrée (19 % des isolats) est ampicilline-streptomycine-sulfoxazole-tétracycline.

Cette étude suggère que les bactéries résistantes aux antibiotiques soient largement répandues dans la viande. Des recherches sont nécessaires pour déterminer si une limitation de l'utilisation des antibiotiques en élevage entraînerait une réduction du nombre de bactéries résistantes dans les aliments.

Résumé des notes prises : Méthodes d'isolement de la FDA.

Méthode *E.coli* : 25 g + 225 ml de BHI, étalements de 200 µl sur Mc Conkey Agar.

Méthode *Salmonella* : 25 g + 225 ml de bouillon lactosé, incubation une nuit, ensemencement en bouillon tétrationate et Rappaport-Vassiliadis. Isolement sur deux gélose sélective (XLT4 agar plus une autre).

Les cultures congelées sont repiquées sur gélose Mc Conkey pour réaliser les tests de résistance aux antibiotiques. Les antibiotiques testés sont l'ampicilline, le chloramphenicol, la streptomycine, le sulfoxazole et la tétracycline. Les résultats obtenus sur *Salmonella* montrent que 61 % des isolats sont résistants à la tétracycline

et 19 % des isolats présentent une multirésistance à l'ampicilline, la streptomycine, le sulfoxazole et la tétracycline.

T23. Distribution et rôle des intégrons dans la multirésistance de *Salmonella* **Lance F. Bolton, USDA-ARS-PMSRU - Athens, USA**

Résumé de l'auteur : Les intégrons sont des éléments génétiques contenant les parties déterminantes du système de recombinaison spécifique de sites. Le système de recombinaison permet l'expression des gènes. Les intégrons ont été associés à la multi-résistance de *Salmonella* aux antibiotiques. L'objectif de cette étude est de déterminer quelle est la distribution des intégrons chez *Salmonella* et quel est le rôle des intégrons dans la résistance multiple aux antibiotiques. Une sonde génétique produite par PCR pour détecter la présence du type le plus commun d'intégrons, classe I, a été utilisée pour tester 1000 souches de *Salmonella* isolées d'animaux (sains ou malades). Le premier facteur associé à la présence des intégrons est le sérotype. 80 % des isolats de *Salmonella typhimurium* contiennent l'intégron. La présence d'intégron est le plus souvent associée à une multi-résistance. 90 % des souches ayant un intégron sont résistantes à au moins 2 antibiotiques contre seulement 7 % des souches ne possédant pas d'intégron. Cette étude suggère que les intégrons jouent un rôle fondamental dans la multi-résistance de *Salmonella* aux antibiotiques.

Résumé des notes prises : Entre 1995 et 1997, une augmentation du nombre d'isolats de *Salmonella* résistants aux antibiotiques a été constatée. En 1995, environ 50 % des souches étaient résistantes contre environ 80 % en 1997. De plus, les résultats montrent qu'une résistance des isolats aux sulfonamides est liée à la présence d'intégrons.

Mardi 3 Août : Session 7 : Problèmes et solutions contre l'augmentation de la résistance des pathogènes aux antimicrobiens traditionnels.

1. Rôle des membranes dans la résistance aux bactériocines, aux antibiotiques et conservateurs

Thomas J. Montville, Cook College, Rytgers University - New Brunswick, USA

Le rôle primaire de la membrane est double : délimiter la cellule, maintenir les composants cellulaires à l'intérieur de la cellule.

Chez les bactéries à Gram positif, la paroi est composée de peptidoglycane, d'un espace périmembranaire et de la membrane plasmique. La composition en acide gras de cette dernière subit des transformations selon les conditions de croissance (modification de la teneur en acides gras insaturés).

Les bactériocines agissent par détérioration de la membrane. Actuellement l'utilisation de la nisine dans les produits laitiers et la viande est autorisée. La résistance à la nisine est de 1 pour 10⁶ cellules. Cette résistance pose le problème de la croissance des bactéries résistantes. De plus, quel est le potentiel de résistance aux bactériocines ? La résistance est-elle intrinsèque ou s'agit-il de résistance croisée ?

Résistance aux antibiotiques des isolats cliniques : si l'action d'un antibiotique se situe au niveau de la membrane, une cellule résistante à cet antibiotique est également résistante à la nisine.

Mécanisme de résistance multiple aux agents antimicrobiens : nisine, sel, pH, thermorésistance

- Spores de *C.botulinum* : l'activité antimicrobienne de la nisine est améliorée par une augmentation de la concentration en NaCl ou une diminution du pH ou les deux.

Les acides gras sont responsables de la rigidité et de la perméabilité de la membrane. La proportion d'acides gras insaturés est plus faible sur les cellules résistantes à la nisine que sur les cellules sensibles. Une diminution de la température engendre une rigidité de la membrane. De même, en présence de nisine on observe une rigidité de la membrane. Plus la proportion d'acides gras insaturés est faible, plus la membrane est rigide et plus la proportion d'acides gras insaturés est importante, plus la membrane est fluide.

Les souches de *L.monocytogenes* et de *C.botulinum* résistantes à la nisine ne sont pas plus thermorésistantes que les souches sensibles à la nisine. Par contre les souches de *L.monocytogenes* résistantes à la nisine sont plus résistantes au sel que les cellules sensibles à la nisine.

Les cellules résistantes à la nisine sont un peu plus sensibles au pH acide que les cellules naturelles. Les cellules naturelles se développent donc plus rapidement à pH acide que les cellules résistantes à la nisine.

Conclusion : caractéristiques des cellules résistantes à la nisine:

- augmentation de la rigidité membranaire
- augmentation de la résistance à d'autres bactériocines
- augmentation de la sensibilité à d'autres inhibiteurs (acides)

2. Apparition de résistance aux agents antimicrobiens utilisés en industrie **P.Mickaël Davidson, University of Tennessee - Knoxville, USA**

Deux types d'agents antimicrobiens chimiques :

- utilisés dans les aliments comme conservateurs : présents naturellement ou ajoutés et autorisés (par exemple la nisine),
- utilisés comme agents de désinfection des surfaces.

Fonction des agents antimicrobiens utilisés comme conservateurs :

- prolonger la durée de vie, préserver la qualité de l'aliment. Ces agents antimicrobiens sont généralement bactériostatiques et pas bactéricides,
- inhiber les pathogènes potentiellement présents : utilisation la plus importante des agents antimicrobiens.

Relations de résistance :

- Scénarios possibles :
 - résistance à un antimicrobien par adaptation
 - résistance croisée entre deux agents antimicrobiens
 - résistance croisée entre des facteurs environnementaux (faibles pH, chauffage) et les agents antimicrobiens
- Origine de la résistance :
 - innée ou intrinsèque
 - acquise directement ou indirectement : due à des expositions répétées
 - résistance croisée
- Résistance aux biocides :
 - principalement intrinsèque
 - résistance non spécifique
 - mécanismes barrière, inactivation

Agents antimicrobiens : Acides organiques (acétique, lactique, propionique), acide benzoïque, acide sorbique, nitrites, sulfites, parabens

Exemple : l'acide benzoïque :

- résistance innée de certaines bactéries et moisissures : passage par " keto adipate"
- résistance acquise pour des levures : *S.cerevisiae*, *H.anomama* et *S.ludwigii*

Exemple : l'acide sorbique :

- résistance innée pour les bactéries lactiques catalase négative, certaines levures et moisissures
- résistance acquise pour les levures osmotolérantes, certaines bactéries et moisissures

Agents antimicrobiens naturels : nisine, natamycine, autres bactériocines et lysozyme

Résistance à la nisine :

- résistance innée liée à la nisinase : enzyme qui détruit la nisine : bactéries lactiques et *Bacillus* spp.
- développement d'une résistance : qui entraîne des modifications des phospholipides, composition en acides gras, altération de la membrane, cations divalents, résistance croisée.

Souches de *L.monocytogenes* résistantes à la leucocine :

- croissance plus lente en BHI sans bactériocine
- compétition entre les cellules sensibles et les cellules résistantes

Problèmes de résistance acquise :

- une seule exposition permet d'avoir des cellules résistantes

- danger des aliments recyclés (retravaillés)
- effet sur la virulence ?

Développement d'une résistance due à l'exposition à un stress :

- facteurs environnementaux : traitement thermique, froid, atmosphère modifiée
- pH, acides organiques

Les pathogènes capables de développer une adaptation aux acides organiques :

- *Salmonella*
- *E.coli* O157:H7
- *L.monocytogenes*

Pas d'adaptation acide :

- acide lactique : *E.coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, *S.aureus*, *Campylobacter jejuni*
- Acides acétique, citrique et malique : *E.coli* O157:H7

Conclusion :

- le développement de résistance aux agents antimicrobiens est un problème,
- résistance croisée entre l'environnement, le procédé, l'acide et les agents antimicrobiens : besoin de plus d'investigations scientifiques,
- utilisation de différents agents antimicrobiens ayant des mécanismes d'action différents : traitement combiné,
- utiliser le bon agent antimicrobien à la bonne concentration (si la concentration utilisée est trop faible, risque élevé de cellules résistantes).

Mardi 3 Août : Session 9 : Listériose touchant plusieurs états des USA : leçons, conséquences et prévention

1. Typage moléculaire de *L.monocytogenes* Martin Wiedmann, Cornell University, Ithaca, USA

L.monocytogenes et listériose aux USA :

- période d'incubation : de 7 à 60 jours
- 1700 cas par an aux USA, 350 à 450 décès par an
- responsable de la plupart des retraits des aliments
- 13 sérotype dont 3 principaux sont impliqués en cas de listériose humaine : 1/2a, 1/2b et 4b. Ce dernier sérotype est retrouvé majoritairement en cas d'épidémie.

Objectifs et hypothèse de recherche :

- Existe-il une différence de virulence entre les différents sérotypes de *L.monocytogenes* ?
- Le critère absence de *L.monocytogenes* est-il adapté ? Si une différence de pathogénie existe entre les divers sérotypes, pourquoi ne pas recherché uniquement la présence des sérotypes pathogènes dans les aliments ?

Comparaison des isolats :

- 150 isolats humains, 100 isolats d'animaux, 100 isolats d'aliments : analyse de l'ADN par PFGE.
- Utilisation de l'automate Riboprinter.
- PCR-RFLP : Deux enzymes de restriction sont utilisées : UhaI et Hpa II. Amplification de deux gènes de virulence actA et hly.
- La combinaison des résultats des deux méthodes donne 90 % de chance de différencier des souches différentes. Avec du sérotypage, on a seulement 70 % de chance de différencier des souches différentes.

Dans l'état de New-York entre janvier 97 et septembre 98, il a été observé entre 0 et 5 cas par mois. En octobre 1998, 8 cas de listériose ont été comptabilisés. Il a été constaté que si, dans un mois, plus de 2 cas se

produisent, les cas supplémentaires appartiennent à un seul et même type. Cela signifie qu'au maximum 3 types sont observés.

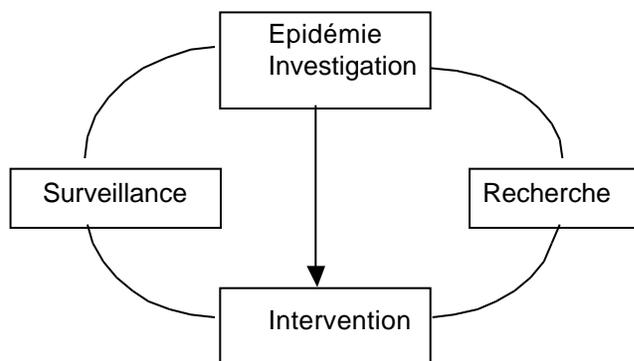
Surveillance sur les produits alimentaires : le type DUP-1053- est présent dans des aliments avec des concentrations parfois supérieures à 3.10^3 UFC/g. Aucun cas de listériose humaine n'est liée à ce type. Par contre, le type DUP-1044A est présent en faible quantité dans les aliments (moins de 0,3 UFC/g) et de nombreux cas de listériose humaine sont liés à ce type.

Conclusion :

- intérêt de la surveillance des maladies alimentaires et des aliments
- il existe apparemment des différences de virulence entre les différentes souches de *L.monocytogenes*.

2. Epidémiologie des épidémies de listériose - Paul Mead, CDC - Atlanta, USA

Ce que l'on apprend pendant les épidémies peut être utilisé dans les cas sporadiques.

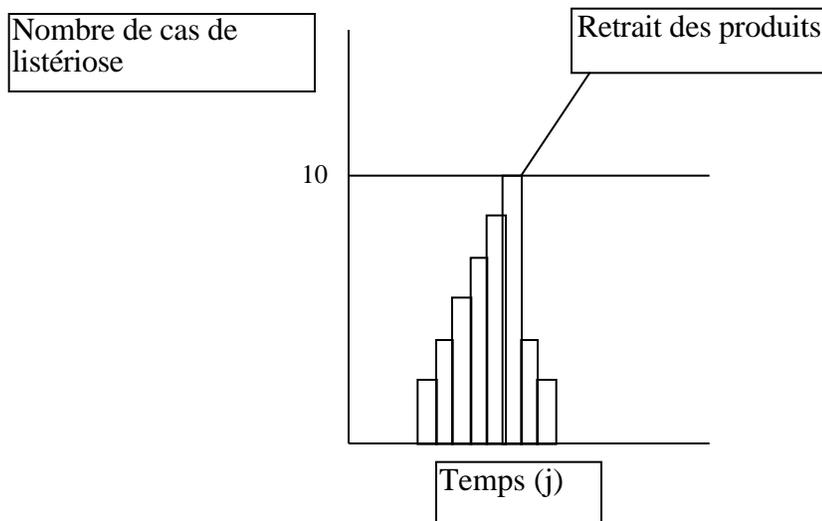


Pulsenet :

- Réseau CDC : laboratoire de santé publique et agence de réglementation des aliments
- Réaliser du typage moléculaire de pathogènes par utilisation d'un protocole standardisé : PFGE
- Utilisation de micro-ordinateurs pour le groupage des souches

Epidémiologie : aux USA entre 3,9 et 5,2 cas/million d'habitant et par an entre 1993 et 1998. *L.monocytogenes* est la première cause de décès liés à l'alimentation : pour 14 décès liés à *Salmonella* spp., 15 décès sont dus à *Listeria monocytogenes*.

En 1998 : 41 patients dont 20 présentent la même souche. Les patients reçoivent un questionnaire concernant leur alimentation sur les quatre dernières semaines. Les résultats de l'enquête montrent que des "hot dogs" seraient à l'origine de la contamination. La marque et l'usine de fabrication des produits contaminés ont été déterminées. La souche de l'épidémie a été retrouvée dans les produits. Le graphique suivant présente l'incidence du retrait des produits contaminés sur le nombre de cas de listériose.



Conclusion :

- Les résultats de cette étude soulignent l'importance du typage moléculaire dans des analyses de routine.
- Il est nécessaire d'évaluer l'effet d'une augmentation de la durée de vie des aliments sur la croissance de *L.monocytogenes*.
- Une information de la population à risque est nécessaire : qui doit faire cette information ?
- Il n'y a pas de diminution de l'incidence de la listériose depuis le début des années 1990 aux USA.

3. Perspectives industrielles par rapport à la listériose

Dane Bernard, National Food Processors Association - Washington, USA

Il est temps de changer la réglementation par rapport au critère *L.monocytogenes* dans les aliments.

L.monocytogenes est largement répandue dans l'environnement et certains aliments. Cela laisse supposer que l'exposition des consommateurs à ce pathogène est régulière et fréquente. Cependant la listériose est une maladie rare.

Données scientifiques :

- La plupart des aliments contaminés contiennent de faibles concentrations en *L.monocytogenes*
- Seules des concentrations élevées posent des problèmes de santé
- Il n'est pas possible d'éliminer totalement ces germes pathogènes
- Il n'est pas nécessaire d'éliminer totalement ces pathogènes
- Par contre, il est indispensable de développer une approche d'analyse des risques.

Mesures préventives :

- Education des consommateurs :
 - risques liés à la conservation des produits au delà de la DLC
 - information des populations à risque
 - information sur les aliments à risque élevé
- Etablir une tolérance à moins de 10^2 *L.monocytogenes/g* pour tous les aliments dans lesquels *L.monocytogenes* ne peut pas se développer.
- Surveillance ciblée : surveillance des aliments ayant une forte probabilité d'être contaminés par *L.monocytogenes*.
- Programmes industriels de contrôle de *L.monocytogenes* : en particulier sur les aliments prêts à l'emploi :
 - procédé qui contient une (ou plusieurs) étape(s) permettant de détruire *L.monocytogenes* : utilisation de HACCP pour la maîtrise de ces étapes

- limiter l'utilisation d'ingrédients contenant *L.monocytogenes*
- limiter la recontamination des produits finis avant conditionnement
- Guide de bonnes pratiques pour éviter la contamination après transformation des produits :
 - aliments prêts à l'emploi
 - détermination et compréhension des voies de contamination :
 - surfaces en contact direct avec les aliments,
 - contamination indirecte par l'environnement,
 - détermination des périodes de production à risque élevé :
 - augmentation de l'activité de production,
 - présence de personnel de nettoyage/désinfection et de production qui ne connaît pas le germe *L.monocytogenes*.
- Programme de surveillance de l'environnement : faire de la prévention:
 - recherche de *Listeria* spp. dans l'environnement : la présence de *L.monocytogenes* n'est pas forcément utile et synonyme de problèmes,
 - déterminer quelles sont les actions à mettre en œuvre si des échantillons ne sont pas conformes : c'est à dire si la contamination est supérieure à la limite de tolérance,
 - si la présence de *L.monocytogenes* est mise en évidence sur des surfaces en contact avec les aliments, il est nécessaire de réaliser des tests sur les aliments.
- Industrie : bloquer tous les lots tant que les résultats d'analyse ne sont pas connus.

NB : la source de *L.monocytogenes* est souvent une niche de l'atelier dans laquelle *L.monocytogenes* s'est établie : il est alors indispensable d'identifier et de détruire cette niche.

Conclusion :

- Le critère "Absence de *L.monocytogenes* / 25 ou 50 g d'aliment" empêche une évolution de l'industrie et des industriels.
- Respecter dans les ateliers les températures de production et limiter les temps d'attente.
- Sur les fromages à pâte molle : une réduction de la durée de conservation (DLUO) pourrait permettre une meilleure maîtrise de *L.monocytogenes*.
- Traitement de l'air.

Mercredi 4 Août : Session 12 : Les pathogènes en progression : *Mycobacterium* spp.

1. Généralités sur *Mycobacterium* spp. et son implication comme pathogène alimentaire Lucia Matharia, University of Guelph - Guelph, Canada

Cet exposé s'organise de façon à répondre aux trois questions suivantes : (1) *Mycobacterium paratuberculosis* est-il pathogène pour l'homme ? (2) *M.paratuberculosis* est-il un nouveau pathogène ? (3) *M.paratuberculosis* est-il un pathogène alimentaire ?

Que sont les pathogènes en progression ?

- Les maladies infectieuses en progression sont définies comme des maladies pour lesquelles l'incidence sur l'homme est en constante augmentation sur les 20 dernières années.
- La progression d'une maladie peut être due à : (1) introduction dans un pays d'un nouvel agent pathogène, (2) maladie qui existait déjà mais qui n'était pas connue (3) changement lié à l'environnement

Mycobacterium spp. :

- bacilles droit ou légèrement incurvé de 1 à 10 µm de long sur 0,2 à 0,6 µm de large
- Gram positif, aérobies, catalase positive
- classés en deux groupes : les espèces à croissance rapide et celles qui sont à croissance lente
- apparition de colonies visibles sur milieu gélosé après 2 à 60 j d'incubation
- colonies de type R (rugueuses) ou S (grasses)
- retrouvés dans le sol, l'eau, le tissu humain et celui des animaux à sang chaud
- trois groupes sont déterminés : (1) les non pathogènes, (2) les pathogènes, (3) les pathogènes opportunistes

Les espèces pathogènes : *M.bovis*, *M.tuberculosis* et *M.paratuberculosis*. Ces trois espèces peuvent être retrouvées dans le lait cru. La transmission à l'homme se fait par l'intermédiaire d'aliments contaminés. Ces

germes pathogènes produisent chez l'homme une maladie identifiable. Les espèces pathogènes de *Mycobacterium* spp. sont donc des pathogènes alimentaires.

M.paratuberculosis peut être détecté dans le lait cru collecté dans des troupeaux infectés. Il peut survivre à la pasteurisation. Ce pathogène a été retrouvé dans du lait pasteurisé en Angleterre et au Pays de Galles. Deux méthodes de détection sont utilisées : IS900 PCR (IS900 est une amorce spécifique de ce germe) et méthode classique par culture sur milieu gélosé.

Caractéristiques :

- *M.paratuberculosis* est un pathogène des ruminants. Il est responsable de la maladie de Crohne.
- La maladie se déclare 2 à 3 ans après l'infection par les pâturages, le lait ou le colostrum.
- Le premier site d'infection est l'iléon. Les symptômes se traduisent par une perte de poids, des diarrhées, une diminution de la production de lait. Les germes sont ensuite capables de passer du tractus intestinal vers le sang.
- La transmission à l'homme se fait par la consommation de lait cru contaminé.
- Chez l'homme, l'analyse des tissus de patients atteints de la maladie de Crohne montre la présence de *M.paratuberculosis*. La présence de *M.paratuberculosis* a été mise en évidence par culture sur milieu gélosé et par PCR.
- Deux antibiotiques (clarithromycine et rafabutine Q) sont efficaces.

Futurs challenges :

- développer de nouvelles méthodes pour le diagnostic,
- développement de vaccins,
- épidémiologie sur d'autres aliments : viande et fromage,
- améliorer les techniques de culture et d'isolement,
- établir une relation claire entre *M.paratuberculosis* et la maladie de Crohne.

2. Survie de *M.paratuberculosis* dans le lait pasteurisé HTST

Judith R. Stabel, National Animal Disease Center - Ames, USA

Dans le lait de vache atteinte de la maladie clinique de Johne, *M.paratuberculosis* est retrouvé à des concentrations inférieures à 1 UFC/ml.

Afin de déterminer la thermorésistance de *M.paratuberculosis* des essais sont réalisés par la méthode en tubes. Deux températures de traitement sont testées : 69 et 71°C. Les résultats obtenus montrent que sur la majorité des souches un traitement de 15 min (à l'une ou l'autre des températures) permet une réduction supérieure à 8 log. Cependant pour certaines souches un traitement de 20 min à 76°C est nécessaire pour obtenir la même réduction.

De plus, des essais sur un pasteurisateur pilote sont réalisés. Le lait est inoculé avec deux concentrations de *M.paratuberculosis* (10^4 et 10^6 UFC/ml). Avant inoculation dans le lait, les cellules de *M.paratuberculosis* sont cultivées dans des cellules animales (100 bactéries par cellule animale). Après traitement thermique, les cellules de *M.paratuberculosis* sont cultivées pendant 6 mois sur gélose HETYM. Les essais de pasteurisation montrent qu'il n'y a pas de bactéries survivantes aux traitements réalisés. Cependant, les résultats de cette étude montrent qu'un traitement HTST (15 s à 72°C) ne détruit pas *M.paratuberculosis* si le niveau de contamination initiale est supérieur à 10 cellules par ml de lait.

En Irlande, une étude réalisée sur des échantillons de lait montre que sur 31 échantillons, la présence de *M.paratuberculosis* a été mise en évidence dans 6 échantillons.

Conclusion : Etant donné que les contaminations initiales du lait cru sont très faibles (< 1 UFC/ml), il ne doit pas y avoir de problèmes sur le lait pasteurisé et les produits laitiers pasteurisés.

3. *Mycobacterium* spp. : pathogènes de l'environnement

Yvonne Taylor, University of Ottawa - Ottawa, Canada

25 à 50 % des patients atteints du sida sont contaminés par *Mycobacterium* spp non responsables de tuberculose (NTM : non tuberculosis mycobacteria). Il semble donc que ce pathogène ait une action sur les personnes très sensibles. Les maladies liées à *Mycobacterium* spp. sont des maladies pulmonaires, des maladies de la peau ou des tissus. Il est actuellement constaté une augmentation du nombre de cas des

maladies liées à *M.ulcerans*. De plus, la distribution géographique des maladies liées à *Mycobacterium* spp. augmente.

Sources environnementales de NTM : eau, sol, animaux, plantes.

Présence de NTM dans les aliments : lait, huîtres, boeuf, porc, œufs

Voies de contamination :

- les aérosols : *M.kansasii* et *M. sanopi*
- inoculation sous-cutanée

Eau :

- eau fraîche et salée : de 0,1 à 500 UFC/ml,
- germe ubiquitaire de l'eau naturelle ou traitée,
- NTM supportent de larges gammes de pH, de température, de salinité et d'oxygénation
- NTM sont capables d'utiliser de nombreux composés comme source de carbone et d'azote,

Les NTM sont capables de former des biofilms en présence de substrat organique, dans des températures moyennes. Dans ce cas, le chlore et autres désinfectants n'ont pas d'activité sur les NTM.

Conclusion :

Actuellement, il est constaté une augmentation des maladies causées par *Mycobacterium* spp. ainsi qu'une augmentation des zones contaminées par *Mycobacterium* spp.

Ces augmentations sont soit de réelles augmentations de l'incidence de *Mycobacterium* spp., soit des augmentations liées à des meilleures méthodes d'analyse et d'investigation.

4. La maladie de Crohne est-elle une maladie due aux pathogènes alimentaires **David Acheson, Tufts University - Boston, USA**

La maladie de Crohne :

- décrite pour la première fois en 1913,
- les symptômes sont proches de ceux de la maladie de Johne : entérite des ruminants causée par *M.paratuberculosis* ,
- Inflammation de l'intestin,
- âge moyen de déclaration de la maladie : 27 ans,
- Localisation géographique : Europe de Nord et Amérique du Nord,
- Peut se développer dans n'importe quelle partie de l'intestin, mais principalement au niveau terminal de l'iléon,
- Inflammation locale avec des ulcères, des aphtes, des polypes ou pseudopolypes.

Facteurs de prédisposition :

- les maladies associées : asthme, rhume des foies, eczéma,
- régime alimentaire : beaucoup de sucre et peu de fibres,
- fumeurs,
- système immunitaire déficient,
 - diminution des cellules T4 chez les patients atteints du sida,
 - après une greffe (ou transplantation) de moelle osseuse, la maladie de Crohne se stabilise,
- L'agent infectieux responsable de la maladie de Crohne n'est pas connu. C'est peut-être *M.paratuberculosis* ,
- *M.paratuberculosis* est responsable de la maladie de Johne chez les animaux.

Maladie de Johne (MJ) versus maladie de Crohne (MC) :

- similitudes :
 - apparition sur des sujets jeunes
 - atteint des sujets d'une même famille
 - lésions de l'iléon
 - entérite
 - déformation des cellules des tissus
- différences
 - Les germes sont rarement retrouvés dans MC,
 - Pas de complications intestinale dans MJ (sténose, inflammation, perforation, abcès),

- réponse immunitaire faible dans MC.

Relation entre la maladie de Crohne et *M.paratuberculosis* :

- utilisation de la PCR,
- culture à partir de prélèvements intestinaux.

Résultats obtenus par PCR sur la maladie de Crohne :

	<i>M.paratuberculosis</i>	Pas de <i>Mycobacterium</i> spp.
Patients	4/31 (12,9 %)	11/31 (35,5 %)
Témoins	0/20	9/20 (45 %)

En France :

	<i>M.paratuberculosis</i>
Patients	13/18 (72 %)
Témoins	7/25 (28 %)

Dans le Missouri (USA) :

	<i>M.paratuberculosis</i>
Patients	1/20 (5 %)
Témoins	0/11

Au Japon : La présence de *M.paratuberculosis* a été mise en évidence sur tous les patients atteints de la maladie de Crohne, et chez 88 % des témoins.

Au Royaume-Uni : La présence de *M.paratuberculosis* a été mise en évidence chez 65 % des patients et 13 % des témoins.

Ces résultats semblent montrer que l'exposition n'est pas la même dans toutes les zones géographiques du monde. En effet, sur la population de témoins, la présence de *M.paratuberculosis* est mise en évidence sur 13 % de la population au Royaume-Uni et 88 % au Japon. Cependant, il est à noter que ces études ont été réalisées avec différentes méthodes de détection. Il est possible que les différences observées dans les résultats soient liées à la méthode de détection utilisée.

Thérapie : les résultats d'une étude testant différents antibiotiques antituberculose (rifampicine, isoniazide, éthambutal) *versus* un placebo ne montrent pas de différence. Les antibiotiques testés ne sont donc pas efficaces. L'utilisation de plusieurs antibiotiques en même temps (rifampicine + macrolide) donne d'assez bons résultats.

- *M.paratuberculosis* est retrouvé chez certains patients, mais également chez des témoins. De plus la présence de *M.paratuberculosis* n'a pas été mise en évidence chez certains patients.

- Les méthodes de culture aux laboratoires donnent des résultats satisfaisants mais elles sont très longues (plusieurs mois de culture) et difficiles à mettre en place.

- L'introduction de *M.paratuberculosis* dans un hôte ne conduit pas forcément au développement de la maladie.

- Il est établi que la maladie de Johne est liée à la présence de *M.paratuberculosis*. Pour la maladie de Crohne, la relation n'est pas non plus claire. Il est nécessaire de réaliser plus d'investigations afin de pouvoir déterminer s'il existe une relation entre la maladie de Crohne et *M.paratuberculosis*, et quels sont les facteurs qui favorisent le développement de la maladie (puisque'il existe des porteurs sains).

- De plus, il a été montré que certains antibiotiques efficaces contre *M.paratuberculosis* favorisent la maladie de Crohne. Outre leur effet sur *M.paratuberculosis*, ces antibiotiques ont un effet sur la flore intestinal et arrivent à favoriser le développement de la maladie.

Les questions sans réponse :

- Vecteurs alimentaires : lait cru, et peut-être la viande
- Est-ce que ce qui est actuellement appelé maladie de Crohne (lié à des symptômes particuliers) a toujours la même origine. La maladie de Crohne comprend peut-être plusieurs maladies encore inconnues.

- Est-ce qu'une partie seulement des maladie de Crohne sont liées à *M.paratuberculosis* ?
- Existe-il d'autres agents impliqués dans la maladie de Crohne ?
- Existe-il certains facteurs qui favorisent le développement (l'expression) de la maladie ?

Conclusion :

- Il est primordial de déterminer si d'autres agents infectieux sont impliqués dans la maladie de Crohne et quel est leur rôle.
- Définir la réponse immunitaire de l'hôte
- Mener des études épidémiologiques sur le sujet
- Etudier le patrimoine génétique des familles dans lesquelles la maladie de Crohne est "fréquente".

5. Méthodes de détection et d'identification de *Mycobacterium* spp. dans l'environnement Sandy Smole, Boston VA Healthcare System - Boston, USA

Mycobacterium avium complex (MAC) :

- Croissance sur milieu gélosé : de 2 à 4 semaines
- Identification : sérotypage, ADN, utilisation de sondes spécifiques ARNr et ADNr, utilisation de la PCR (gène hsp65)
- Germe ubiquitaire
- La transmission de personne à personne n'est pas mise en évidence

Méthode de détection :

<u>Etapes</u>	<u>Méthode</u>	<u>Incubation</u>
Décontamination	NaOH et CPC (0,004 %)	
Séparation	Centrifugation et filtration (0,45µm)	
Milieu de culture	7H10, L-J, gélose à l'oeuf Gélose en pente recouverte de paraffine	4 semaines à 40°C
Supplément antifongique	Cycloheximide + 2 autres agents inhibiteurs	

Pour la décontamination, 2 méthodes sont utilisées : méthode avec NaOH et méthode avec CPC.

Méthode d'identification : par PCR . Utilisation des enzymes BstEII et HaeIII, et d'une amorce spécifique du gène hsp 65 (amplification d'un fragment de 441 paires de bases)

Echantillons analysés :

- 1489 échantillons d'eau 2978 filtrations

Résultats :

Sur les 1489 échantillons analysés, 94 présentent des contaminations (la présence de *Mycobacterium* spp. ne peut pas être mise en évidence dans ces échantillons), 230 échantillons sont contaminés par *Mycobacterium* spp., 563 ne présentent aucune croissance microbienne et la présence de levure est notée sur 602 échantillons.

L'incidence de *Mycobacterium* spp. varie de 15 à 25 % selon les prélèvements réalisés. 25 % des eaux de l'environnement sont contaminées et 15 % des eaux de piscine (chauffée ou non) et des eaux des toilettes sont contaminées. Plus de 50 % des échantillons d'eau chaude utilisée en milieu médical sont contaminés.

Comparaison de l'incidence de *Mycobacterium* spp. selon que l'eau chaude est recyclée ou non. Aux USA, 60 à 70 % des établissements médicaux utilisent un recyclage de l'eau chaude.

Recyclage de l'eau : température comprise entre 45 et 55°C. Présence de *M.avium* dans 31,9 % des échantillons

Eau non recyclée : présence de *M.avium* dans 1 à 2 % des échantillons.

Conclusion :

L'eau chaude recyclée est un vecteur de contamination en milieu hospitalier. Cela peut expliquer l'incidence élevée de *Mycobacterium* spp. chez les patients atteints du sida.

Mercredi 4 Août : Session 15 : *Campylobacter* et sécurité alimentaire : l'état de l'art

1. Prévalence de *Campylobacter* dans les maladies humaines - CDC, Atlanta, USA

Campylobactériose :

- période d'incubation de 3 à 4 jours,
- Système de surveillance de *Campylobacter* depuis 1982.

Programme de surveillance de l'évolution des infections (EIP : Emerging Infection Program)

Dans ce programme, 7 pathogènes sont surveillés dont *Campylobacter*, *E.coli*, *L.monocytogenes*, *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio*

Campylobacter est le premier pathogène alimentaire responsable d'infection.

Incidence : *Campylobacter* > *Salmonella* > *Shigella* > *E.coli*

En 1998, de 10 à 40 cas de campylobactériose pour 100 000 habitants ont été dénombrés selon les états. Sur les enfants de moins de 1 an, l'incidence de *Campylobacter* est de 60 cas pour 100 000 par an. Sur les autres tranches de la population, l'incidence est voisine de 10 cas pour 100 000 par an. Les campylobactérioses sont fatales dans 0,5 % des cas.

Limite du système de surveillance :

- méthode d'analyse des échantillons,
- totaliser le nombre de cas de campylobactériose.

Aux USA, 95 % des laboratoires proposent la recherche de *Campylobacter* en analyse de routine, 44 % des médecins prescrivent une analyse des selles de leurs patients. Pour 3 377 cas reportés, le nombre de cas réel est estimé à 2 400 000.

Aliments responsables : viande de poulet, lait cru et boeuf. Le lait cru et le boeuf ont, à l'origine, été contaminés par des poulets par l'intermédiaire de l'eau.

Développement futurs : Travaux sur l'antibiorésistance :

- les antibiotiques sont utilisés comme facteurs de croissance dans l'alimentation des poulets,
- augmentation de la proportion de souches de *Campylobacter* résistantes aux antibiotiques aux USA.

2. Méthode de détection de *Campylobacter* spp. - J. Eric Line, USDA - Athens, USA

Bouillon d'enrichissement : BF-BEB

Gélose d'isolement : Agar Campy-line (avec ou sans sang)

Dénombrement : selon la méthode FSIS

Session 17 : Sécurité des produits de la mer

1. Recherche de *Listeria* dans les produits de la mer

Catherine Donnelly, University of Vermont - Burlington, USA

8,7 % des produits de la mer prêts à l'emploi sont contaminés par *Listeria* aux USA.

En Italie, en 1989, il a été établie une relation entre des cas de listériose et du poisson.

En 1991-92, en Australie et Nouvelle-Zélande, des cas de listériose ont été liés à la consommation de moules fumées.

Cellules stressées :

- après un traitement sublétal les cellules de *Listeria* stressées sont capables de se "réparer" et de retrouver leur pathogénie.
- Traitement thermique : les valeurs de D déterminer au laboratoire sont plus faibles si l'on utilise des géloses sélectives que des géloses non sélectives.
- La durée d'incubation est très importante : sur des cellules stressées, après 24 h d'incubation aucune colonie n'est visible. Des colonies sont susceptibles d'apparaître après 6 à 9 jours d'incubation.

Comparaison des méthodes de détection de *Listeria* spp. :

- méthode de l'USDA/FSIS : 74 % des échantillons contaminés sont détectés,
- méthode de la FDA : 65 % des échantillons contaminés sont détectés,
- méthode NGFIS : 74 % des échantillons contaminés sont détectés.

Afin de détecter 90 % des échantillons contaminés, il est nécessaire d'utiliser au moins deux méthodes en parallèle. Ces résultats montrent que, lors des analyses de routine, des échantillons positifs ne sont pas détectés.

Les méthodes rapides sont limitées par rapport à leur seuil de sensibilité : entre 10^4 et 10^5 UFC/ml après enrichissement.

Les cellules stressées sont sensibles aux agents inhibiteurs présents dans les milieux sélectifs utilisés.

Le bouillon LRB (*Listeria* Repair Broth) est un bouillon qui permet la "réparation" des cellules stressées. Ce bouillon est un bouillon TSB dans lequel les agents inhibiteurs sont ajoutés après 5 h d'incubation. Une étude comparative montre que, dans des conditions d'incubation identiques, une augmentation de 6 log de la population de *Listeria* est observée en LRB alors que cette augmentation n'est que de 2 à 3 log avec les bouillons sélectifs classiques (Bouillon de la méthode USDA ou UVM).

Comparaison de la croissance dans différents bouillons :

- temps de latence : le temps de latence en bouillon Fraser est de 14 h contre moins de 10 h avec les autres bouillons sélectifs.
- temps de génération (TG) : le TG en bouillon Fraser est de 0,8 h contre 0,4 h avec le bouillon LRB.

Sur 80 échantillons positifs, 82,5 % sont détectés avec le bouillon UVM incubé 24 h et 81,3 % sont détectés avec le bouillon LRB incubé 24 h. Avec un second bouillon d'enrichissement 93,8 % des échantillons sont détectés. Ces résultats montrent que, bien que la croissance de *Listeria monocytogenes* soit plus rapide en LRB, les bouillons LRB et UVM sont équivalents pour la détection de *Listeria monocytogenes* dans les échantillons.

Réponse au stress de l'environnement :

- on observe une augmentation de la proportion de cellules virulentes,
- les mutants (liés au stress) sont plus virulents que la souche mère,
- production de protéines de stress pour un choc thermique chaud,
- production de protéines de stress pour un choc thermique froid,
- production de protéines de stress pour une adaptation aux faibles températures,

- la synthèse de ces différentes protéines pourrait expliquer les phénomènes de résistance croisée avec le pH et le sel. Des cellules ayant subies un choc thermique sont plus résistantes que des cellules témoin à un stress acide ou salin.

Listériose aux USA : en 1993, 1093 cas et 248 décès.

2. Contamination par *Vibrio vulnificus* et *Vibrio parahaemolyticus* dans les produits de la mer Angelo Depaola, FDA - Dauphin Island, USA

Etude sur des huîtres :

Vibrio vulnificus :

- infection: septicémie primaire et gastro-entérites,
- maladie du foie,
- cas sporadiques uniquement (pas d'épidémies),
- consommation d'huîtres crues (sur les côtes aux USA),
- contamination des huîtres entre avril et octobre,
- mode de virulence et dose infectieuse non connus : la virulence serait liée à une hémolysine contenue dans une capsule.

Vibrio parahaemolyticus :

- septicémie primaire et gastro-entérite,
- responsable de gastro-entérite chez la population normale,
- présence dans les coquillages crus et des produits de la mer cuits recontaminés : dans tout le pays,
- cas sporadiques et épidémies,
- contamination saisonnière sauf sur les côtes,
- la virulence est associée au gène tdh et la dose infectieuse serait voisine de 100 000 UFC.

Objectifs de l'étude :

- déterminer le niveau d'exposition : c'est à dire déterminer d'une part le niveau de contamination des produits et d'autre part déterminer la quantité de produits consommés crus,
- collecter des souches de *Vibrio vulnificus* pour faire une différenciation des souches.

Matériel et méthodes :

- 370 lots de produits analysés entre juin 98 et juin 99

NB : l'origine des produits a également été prise en compte dans cette étude. 71 % des échantillons ont été prélevés dans des restaurants et 27 % des échantillons ont été prélevés sur le marché.

Dénombrement de *Vibrio vulnificus* : dénombrement selon la méthode FDA BAM (NPP sur 5 tubes). Bouillon d'enrichissement : APW ; gélose d'isolement : mCPC, identification EIA. Les dénombrements sont également réalisés par étalement direct.

Dénombrement de *Vibrio parahaemolyticus* : dénombrement par NPP (sur 5 tubes) selon la méthode BAM modifiée. Enrichissement en bouillon APW. Isolement sur gélose TCBS. Identification par sonde d'ADN (ti-AP) et tests API.

Résultats :

Vibrio vulnificus dans les huîtres du marché :

Pour les échantillons provenant du Canada, de la côte de l'Atlantique Nord et de la côte ouest, la présence de *Vibrio vulnificus* a été mise en évidence dans 20 % des échantillons. 95 % des échantillons provenant du golfe (Gulf coast) sont contaminés par *Vibrio vulnificus* .

Niveau de contamination sur ces derniers échantillons, :

- < 10/g sur les mois de janvier, février et mars,
- de 10^2 et 10^3 /g en avril,
- de 10^3 à 10^4 / g de mai à novembre,
- de 10 à 10^2 /g en décembre

Nombre de cas :

- < 2 par mois sur janvier, février et mars
- 14 cas par mois de mai à novembre

Vibrio parahaemolyticus :

Pour les échantillons provenant du Canada, de la côte de l'Atlantique Nord et de la côte ouest, la présence de *Vibrio parahaemolyticus* a été mise en évidence dans 50 % des échantillons.

Pour les échantillons provenant du milieu de l'Atlantique, la présence de *Vibrio parahaemolyticus* a été mise en évidence dans 80 % des échantillons.

95 % des échantillons provenant du golfe (Gulf coast) sont contaminés par *Vibrio parahaemolyticus*.

Niveau moyen de contamination sur un an en fonction de l'origine:

Atlantique : 30 ufc /g

Golfe : 110 ufc /g

Pacifique : 21 ufc /g

Niveau de contamination selon les saisons :

- < 1 / g pour les mois de janvier, février et mars
- de 10 à 10² / g en décembre
- de 10² à 10⁴ / g de mai à novembre

Conclusion :

Les échantillons du golfe et de milieu de l'atlantique sont plus contaminés que ceux d'autres origines. La distribution saisonnière du nombre de cas suit la distribution saisonnière de la contamination des produits.

3. Groupe de travail sur les épidémies à *Vibrio parahaemolyticus* sur la côte ouest Charles Kaysner, FDA, Bothell, USA

En 1997, une épidémie à *Vibrio parahaemolyticus* a eu lieu aux USA et a été reliée à la consommation de coquillages crus.

Environnement :

- Présent dans l'eau quand la température est supérieure à 15°C,
- salinité : de 10-25 g/l,
- température optimale : 35-37°C,
- température minimale : 10-12°C.

Dans cette étude, des aliments et des cas cliniques ont été analysés en parallèle.

Relation entre contamination des produits et épidémie :

- > 10 000 /g : épidémie confirmée,
- de 5000 à 10 000 /g : 20 cas sur 30 jours,
- de 1 000 à 5 000 /g : 10 à 20 cas sur 30 jours,
- de 100 à 1000 /g : 2 à 5 cas sur 30 jours.

L'intérêt de cette étude est l'analyse en parallèle de la contamination des produits et le suivi du nombre de cas. Cette étude devrait permettre d'avoir une idée sur la dose infectieuse.

Ce type d'étude pourrait être appliquée à d'autres germes et d'autres produits. Cependant, pour cela, il est essentiel que l'origine d'un germe pathogène alimentaire soit restreinte.

ASEPT

L'Hygiène dans la Qualité

BP 2047 - 53020 Laval Cedex 9 - France

Tél. 33 (0)2 43 49 22 22 Fax 33 (0)2 43 53 36 53 E-mail : asept@asept.fr

<http://www.asept.fr>