

Fréquence et répartition de la contamination des ensilages par *Listeria monocytogenes*

J.M. GAUTIER (1), V. HEUCHEL (2), C. LAITHIER(3), D. RIBAUD(2)

(1) Institut de l'Élevage, BP 18, 31321 Castanet Tolosan Cedex

(2) Institut de l'Élevage, 149, rue de Bercy, 75595 Paris Cedex 12

(3) Institut de l'Élevage, Actipole, 5, rue Hermann Frenkel, 69364 Lyon Cedex 07

RESUME - La fréquence et la variabilité des niveaux de contamination par *Listeria monocytogenes* (*Lm*) des ensilages de maïs et d'herbe, des balles rondes enrubannées et des foin ont été estimées à partir d'un sondage aléatoire, sur un échantillon représentatif d'exploitations laitières. Pour les ensilages, la répartition de cette contamination dans le fourrage et son évolution ont été étudiées sur une centaine de silos, suivis depuis leur confection jusqu'à la fin de leur utilisation.

On n'a pas observé de différence significative entre les estimations de fréquence de contamination des différents fourrages étudiés, soit 7,5 % et 7,4 % respectivement pour les ensilages d'herbe et de maïs, 4,4 % pour les foin et 4,1 % pour les balles rondes enrubannées. Les concentrations en *Lm* dans les échantillons positifs sont toujours inférieures au seuil de dénombrement (moins de 10 UFC/g) dans les foin et les balles rondes. Dans les ensilages, la moitié est inférieure à 10 UFC/g et près de 70 % inférieures à 1000 UFC/g. En moyenne, 74 % des échantillons positifs observés dans les ensilages ont été prélevés dans la partie périphérique du front d'attaque des silos. Les fréquences de contamination sur les prélèvements de fourrage vert ensilé sont respectivement de 34 et 70 % pour les ensilages d'herbe et de maïs et les dénombrements mesurés dans ces prélèvements sont faibles : 81 % sont inférieurs à 10 UFC/g et le reste toujours inférieur à 1 000 UFC/g.

Après l'ouverture des silos suivis pendant leur utilisation, *Lm* n'a été isolée que de façon très épisodique dans quelques ensilages et plus de deux fois successivement dans seulement 6 % des ensilages de maïs et 3 % des ensilages d'herbe. Elle n'a jamais été isolée à plusieurs reprises dans les séries de prélèvements réalisées le même jour sur le même silo. D'une façon générale, la contamination des ensilages par *Lm* apparaît donc très ponctuelle et localisée par niches de faible volume dans la masse totale du fourrage conservé.

Frequency and distribution of the contamination by *Listeria monocytogenes* in silages

J.M. GAUTIER (1), V. HEUCHEL (2), C. LAITHIER(3), D. RIBAUD(2)

(1) Institut de l'Élevage, BP 18, 31321 Castanet Tolosan Cedex

SUMMARY - Frequency and concentration's variability of the contamination by *Listeria monocytogenes* (*Lm*) in maize and grass silages, wrapped round bale silage and hay were estimated from a representative population of randomly sampled dairy farms. For the silages, distribution and evolution of this contamination were studied on a hundred silos, from their making to the end of their use.

The frequencies of contamination were 7.5 % and 7.4 % respectively for the grass and maize silages, 4.4 % for the hays, and 4.1 % for the wrapped round bale silage, and were not significantly different. Concentrations in the positive samples were always lower than the threshold of counting (less than 10 UFC/g) in the hays and the wrapped big bale silage. In the silages, the half were lower than 10 UFC/g., and nearly 70 % lower than 1000 UFC/g. On average, 74 % of the positive samples observed in silages were sampled in the peripheral part of the silos front. The frequencies of contamination of ensiled green fodder were respectively 34 % and 70 % for the the grass and maize silages, with low concentrations : 81 % lower than 10 UFC/g, and remained always lower than 1 000 UFC/g.

After the opening of the silos, *Lm* has been detected in a very episodic way in some silages, and more than twice successively in only 6 % of maize silages, and 3 % of grass silages. It was never detected several times in the sampling carried out the same day on the same silo. In a general way, contamination of silage by *Lm* appears very sporadic, and located in pinpoint parts in the total mass of the fodder.

INTRODUCTION

La présence et le développement possibles de *Listeria monocytogenes* (*Lm*) dans les fourrages fermentés (ensilages et balles rondes enrubannées) sont rapportés par de nombreux auteurs (Gronston, 1979, Fenlon, 1985, Perry et Donnelly, 1990, Corrot *et al.*, 1998, Laithier *et al.*, 2000). L'utilisation de ces fourrages dans l'alimentation des troupeaux laitiers représente un risque vis-à-vis de la qualité sanitaire du lait et des produits au lait cru (Sanaa *et al.*, 1993, Meyer-Brosseta, 2002). De ce fait, leur abandon dans les exploitations dont le lait est destiné à la fabrication des fromages sensibles, notamment certaines AOC, est envisagé dans certaines régions. Cependant, il n'existe pratiquement pas de données statistiques sur la fréquence et l'importance de la contamination des différents types de fourrages fermentés, relativement à celles du foin, ni sur l'évolution et la répartition de la contamination dans ces fourrages. La présente étude a été conduite par l'Institut de l'Élevage pour acquérir de telles données, plus particulièrement sur les ensilages, afin d'évaluer objectivement les risques liés à leur utilisation, dans la perspective de l'appréciation quantitative et de la gestion des risques sanitaires associés à la consommation de fromages au lait cru. Elle a été réalisée dans le cadre du programme Aliment Qualité Sécurité 2000, avec la collaboration de l'ENV Alfort, de l'INRA, de différents organismes professionnels agricoles et d'une entreprise laitière.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. ESTIMATION DE LA FREQUENCE ET DES NIVEAUX DE CONTAMINATION DES FOURRAGES CONSERVES

La fréquence et la variabilité des niveaux de contamination par *Listeria* des ensilages de maïs (EM) et d'herbe (EH), des balles rondes enrubannées (BRE) et des foin ont été estimées par sondage, sur un échantillon représentatif. Les données ont été recueillies entre les années 2000 et 2003 à partir d'une base de sondages rassemblant les listes exhaustives d'exploitations laitières réparties dans six régions (Aquitaine, Auvergne, Centre, Lorraine, Normandie, Rhône Alpes) et utilisatrices des différents types de fourrages conservés. Pour chaque type de fourrage, 70 à 120 exploitations ont été tirées au sort dans cette base. Un technicien est passé une fois dans chacune de ces exploitations, pour prélever des échantillons sur les fourrages et réaliser une enquête afin d'évaluer leurs conditions de récolte, de conservation et de distribution. Les prélèvements d'échantillons ont été effectués selon le protocole suivant :

- sur les ensilages, deux échantillons d'environ 300 g issus de deux mélanges de prélèvements de fourrage représentatifs du front d'attaque, répartis respectivement dans sa partie périphérique (zone située à moins de 50 cm des bords du silo) et dans sa partie centrale,
- sur les BRE et les foin, un échantillon d'environ 300 g issu d'un mélange de prélèvements réalisés dans une balle, ou une botte, choisie au hasard dans le fourrage stocké.

Dans tous les cas, les parties visiblement altérées des fourrages n'ont pas été prélevées. Sur tous les échantillons, les analyses suivantes ont été réalisées : recherche de *Listeria spp* (ALOA®, *Listeria* Rapid Test®) et en cas de présence, recherche et dénombrement de *Lm* (Hybridation moléculaire, ISO 11290-2). Pour les ensilages, le pH moyen

des zones prélevées a également été mesuré, ainsi que le taux de matière sèche (MS) pour les ensilages d'herbe.

1.2. REPARTITION ET EVOLUTION DE LA CONTAMINATION DANS LES ENSILAGES

Afin de décrire la répartition de la contamination du fourrage dans les silos et d'observer son évolution, 32 EH et 64 EM ont été suivis entre 2000 et 2003, depuis leur confection jusqu'à la fin de leur utilisation. Pour chacun, le protocole de suivi était le suivant :

- Lors du chantier d'ensilage, une enquête était réalisée sur les conditions de récolte du fourrage et de confection du silo et des échantillons représentatifs du fourrage vert ensilé étaient prélevés.

- Après ouverture du silo et jusqu'à la fin de son utilisation, une dizaine de passages successifs, espacés sur la durée d'utilisation du silo, ont été effectués. Lors de chaque passage, l'évolution des conditions de conservation et de distribution était enregistrée et des échantillons de fourrages prélevés sur le front d'attaque du silo, selon les mêmes modalités que celles décrites dans le paragraphe 1.1.

- Enfin, à l'occasion d'un passage, 10 échantillons ponctuels d'environ 20g de fourrage ont été prélevés sur le front d'attaque (6 à la périphérie et 4 au centre) dans 24 EH et 23 EM, afin d'étudier la répartition spatiale de la contamination.

Les analyses des échantillons de fourrages ont été réalisées selon les mêmes méthodes que celles indiquées dans le paragraphe 1.1.

2. RESULTATS

2.1. FREQUENCE ET NIVEAUX DE CONTAMINATION DES FOURRAGES

Les fréquences moyennes de contamination des différents types de fourrage, estimées à partir du protocole de sondage décrit dans le paragraphe 1.1, sont présentées dans le tableau 1. Ces résultats distinguent les cas suivants : présence de *Lm* seule, présence d'autres espèces de *Listeria* (*La*) et présence conjointe de *Lm* et de *La*.

Tableau 1 : Fréquence de contamination des différents fourrages.

		Foin	BRE	EH	EM	F*
Effectif total		68	72	120	81	
Présence de <i>Lm</i>	n	3	3	9	6	
	(%)	(4,4)	(4,1)	(7,5)	(7,4)	NS
Présence de <i>La</i>	n	7	13	18	11	
	(%)	(10,3)	(18,1)	(15)	(13,6)	NS
Présence de <i>Lm</i> et <i>La</i>	n	0	3	6	3	
	(%)	(0)	(4,1)	(5)	(3,7)	NS
Absence de <i>Lm</i>	n	65	69	111	75	
	(%)	(95,6)	(95,8)	(92,5)	(92,6)	

* Test de Fisher. NS : différence non significative

On n'observe pas de différence significative entre les fréquences de contamination par *Lm* des ensilages, des BRE et des foin. Celles des EH et EM, de l'ordre 7,5 %, tendent à être un peu plus élevées que celles des BRE et des foin, de l'ordre de 4 %. L'analyse des résultats des enquêtes montre que les conditions météorologiques lors de la récolte, la durée de stockage lors des prélèvements et les conditions de confection, de conservation et de distribution étaient en moyenne comparables entre les différents types de fourrages étudiés.

Sur tous les fourrages, la présence d'autres espèces de *Listeria* est plus fréquente que celle de *Lm*, mais n'y est associée que dans moins de 35 % des cas (de 33,3 % pour les EH, à 0 % pour les foin).

Les concentrations en *Lm* dans les échantillons positifs sont présentées dans le tableau 2. Elles sont toujours inférieures au seuil de dénombrement (moins de 10 UFC/g) dans les foin et les BRE. Dans les ensilages, les dénombrements sont inférieurs à 10 UFC/g dans 50 % des cas et inférieurs à 1000 UFC/g dans près de 70% des cas.

Tableau 2 : Dénombrement de *Listeria monocytogenes* dans les échantillons de fourrages positifs

Dénombrement (UFC/g)	Foin	BRE	EH	EM
< 10	3	3	6	2
10 – 1 000	0	0	2	1
1 000 – 100 000	0	0	1	2
100 000 – 1 000 000	0	0	1	0
> 1 000 000	0	0	0	1

2.2. REPARTITION DE LA CONTAMINATION PAR *LISTERIA MONOCYTOGENES* DANS LES ENSILAGES

Lm a été isolée dans 74 des 2314 échantillons prélevés sur l'ensemble des ensilages suivis dans les deux volets de l'étude (cf. paragraphes 1.1 et 1.2), soit 3 % d'échantillons positifs. La répartition de ces échantillons en fonction de la zone de prélèvement et leur niveau de contamination, sont présentés dans le tableau 3. La majorité a été prélevée dans la partie périphérique du front d'attaque des ensilages (respectivement 65 % pour les EH et 82 % pour les EM), où les dénombrements observés sont en moyenne plus élevés que dans la partie centrale, dans laquelle, à une exception près les niveaux de contamination sont inférieurs à 1000 UFC/g.

Tableau 3 : Localisation et dénombrement de *Listeria monocytogenes* dans les échantillons d'ensilage positifs

Dénombrement (UFC/g)	EH		EM	
	Centre	Périphérie	Centre	Périphérie
< 10	8	14	5	19
10 – 1 000	3	3	2	6
1 000 – 100 000	0	4	0	4
100 000 – 1 000 000	1	1	0	2
> 1 000 000	0	0	0	1
Total	12	22	7	32

Dans les 62 silos d'herbe et de maïs sur lesquels des prélèvements ponctuels destinés à l'étude de la répartition spatiale de la contamination sur le front d'attaque ont été réalisés (cf. paragraphe 1.2), *Lm* n'a été isolée que dans 5 échantillons sur 372 en zone périphérique et dans 1 sur 248 en zone centrale, soit respectivement dans 1,3 % et 0,4 % des cas. Elle n'a jamais été isolée à plusieurs reprises dans les séries de prélèvements réalisées le même jour sur le même silo.

Tableau 4 : Moyennes des pH mesurés sur les échantillons en fonction de leur contamination par *Listeria monocytogenes* et des zones de prélèvement sur le front d'attaque du silo.

	Echantillons négatifs		Echantillons positifs	
Ensemble	4,16 (0,58)		4,50 (0,64)	
Ensilage d'herbe	4,57 (0,54)		4,99 (0,41)	
Centre	4,48 (0,50)		4,88 (0,40)	
Périphérie	4,67 (0,55)		5,05 (0,42)	
Ensilage de maïs	3,88 (0,41)		4,05 (0,45)	
Centre	3,76 (0,32)		3,77 (0,16)	
Périphérie	4,01 (0,45)		4,11 (0,47)	

Entre parenthèses l'écart type.

Pour l'ensemble des ensilages étudiés, le pH moyen des zones de prélèvements dans lesquels *Lm* a été isolée a tendance à être plus élevé que celui des zones dans lesquelles on n'a pas constaté de contamination (Tableau 4). Cette tendance est observée pour chaque type d'ensilage et pour chaque zone de prélèvement.

2.3. EVOLUTION DE LA CONTAMINATION DANS LES ENSILAGES AU COURS DE LEUR UTILISATION

Les résultats sur l'évolution de la contamination des ensilages depuis leur confection jusqu'à la fin de leur utilisation sont présentés dans le tableau 5, où figurent le nombre et le pourcentage de silos dans lesquels *Lm* a été isolée, en fonction de l'ordre des passages successifs pour la réalisation des prélèvements.

Tableau 5 : Evolution de la contamination des ensilages par *Listeria monocytogenes*

N° passage	Ensilage d'herbe			Ensilage de maïs		
	Nombre de silos	Silos positifs n	%	Nombre de silos	Silos positifs n	%
1*	32	11	34	64	45	70
2**	30	3	10	62	4	6
3	30	2	7	62	2	3
4	30	2	7	58	3	5
5	30	4	13	57	5	9
6	30	1	3	57	2	4
7	29	3	10	56	4	7
8	28	2	7	51	4	7
9	23	1	4	41	4	10
10	16	0	0	32	3	9
11	2	0	0	6	0	0
12				1	0	0
Total***	225	18	8	483	31	6

* : confection du silo, ** : ouverture du silo,

*** : du 2^{ème} au dernier passage.

Les fréquences de contamination par *Lm* des fourrages verts, estimées à partir des prélèvements réalisés lors de la confection des ensilages, sont respectivement de 34 % et 70 % pour les EH et pour les EM. Les dénombrements mesurés dans ces prélèvements sont généralement très faibles : 81 % sont inférieurs à 10 UFC/g et le reste toujours inférieur à 1 000 UFC/g.

Après l'ouverture des silos, *Lm* n'a été isolée que de façon très épisodique dans quelques ensilages et plus de deux fois successivement dans seulement 5 silos (4 EM et 1 EH).

On n'observe pas de liaison significative entre la fréquence des prélèvements contaminés et l'intervalle de temps entre l'ouverture des silos et la réalisation des prélèvements. On n'observe pas non plus d'effet de la durée de stockage des fourrages sur les niveaux de contamination.

Dans 71 % des EM et 63 % des EH où la contamination des fourrages verts avait été observée, *Lm* n'a plus été isolée par la suite. A l'inverse, elle a été isolée à une ou plusieurs reprises après ouverture des silos dans 32 % des EM et 21 % des EH où sa présence n'avait pas été mise en évidence sur les fourrages verts.

3. DISCUSSION

Les résultats de la première partie de cette étude ne montrent pas de différence significative entre les fréquences de contamination des fourrages fermentés et du foin par *Listeria* en général et par *Lm* en particulier. Ces fréquences ont été estimées selon un protocole analogue entre les

différents types de fourrages étudiés, à partir d'un échantillonnage représentatif des conditions de confection et d'utilisation de ces fourrages en France. Les enquêtes réalisées dans les exploitations lors du prélèvement des échantillons ont permis d'apprécier la qualité de conservation des fourrages et de vérifier qu'en moyenne cette qualité était comparable entre les différents types étudiés. Les fréquences de contamination par *Lm* observées ici sont très proches de celles rapportées par les quelques auteurs ayant travaillé sur des effectifs et selon des protocoles d'échantillonnage similaires à ceux de cette étude. Sur des ensilages d'herbe en Ecosse, Fenlon (1985) a observé des fréquences de contamination de 2,5 % et de 5,9 % sur deux années consécutives. Dans le Vermont, Perry et Donnelly (1990) font état de fréquences de 2 et de 4 %, respectivement sur des ensilages de maïs et d'herbe. Les fréquences de contamination estimées lors d'un sondage effectué par l'INRA entre 1990 et 1992 dans plusieurs régions françaises, étaient respectivement de 12,5 et de 5,1 % sur des ensilages de prairies permanentes et de prairies temporaires. Sur des BRE confectionnées également à partir de prairies permanentes et temporaires, ces fréquences étaient respectivement de 6,5 et 0 % (Marly, 1993). Sur les foin, des fréquences de contamination soit très faibles (Fenlon *et al.*, 1995), soit élevées ont été rapportées (Husu *et al.*, 1990), mais on ne dispose malheureusement pas de statistiques comparables à celles de cette étude. Si les fréquences de contamination par *Lm* apparaissent assez proches entre les différents types de fourrages étudiés, les distributions des niveaux de contamination sont en revanche très différentes entre les BRE et les foin d'une part et les ensilages d'autre part: les concentrations en *Lm* sont toujours inférieures au seuil de dénombrement pour les premiers, alors qu'elles sont supérieures à ce seuil dans 50 % des échantillons positifs pour les ensilages, avec parfois des niveaux supérieurs à 10⁶ UFC /g. Pour ces fourrages, ce résultat est conforme à ce qu'ont observé de nombreux auteurs (Fenlon, 1986, Sanaa, 1993, Stahl *et al.*, 1996). Sur les BRE, des concentrations plus élevées ont été décrites (Fenlon *et al.*, 1989, Corrot *et al.*, 1998).

Les résultats obtenus sur la répartition de la contamination dans les ensilages, à savoir une fréquence d'échantillons positifs et des concentrations beaucoup plus élevées dans les parties superficielles que dans la masse du fourrage, ainsi que sur l'incidence du pH sur la contamination, sont en accord avec la littérature (Fenlon, 1989, Sanaa *et al.*, 1993, Stahl *et al.*, 1996). Ils confirment l'importance d'assurer dans l'ensilage de bonnes conditions d'anaérobiose permettant une acidification suffisante pour empêcher le développement de *Lm* dans les fourrages après leur récolte. Comme l'on fait de nombreux auteurs auparavant (Husu *et al.*, 1990, Fenlon *et al.*, 1996, Marly, 1993, Hartheiser, 1995, Corrot *et al.*, 1998), on a constaté que les fourrages verts étaient fréquemment contaminés, à de faibles concentrations, avant leur ensilage. En revanche, dans tous les silos qui ont été suivis et prélevés régulièrement pendant la durée de leur utilisation, *Lm* n'a été isolée que de façon très épisodique. De plus, lorsque plusieurs échantillons ont été prélevés sur le front d'attaque d'un même silo, un au plus s'est avéré contaminé. Ces résultats sont originaux et suggèrent que dans la majorité des cas et contrairement à

d'autres espèces bactériennes (*Clostridium tyrobutyricum*, par exemple), *Lm* ne colonise le fourrage que de façon très ponctuelle, dans des niches de très faible volume.

CONCLUSION

Les résultats de cette étude montrent que les risques associés à la contamination par *Lm* des fourrages fermentés et plus particulièrement des ensilages, sont plus liés aux concentrations élevées qu'on peut y trouver qu'à la fréquence de cette contamination, qui s'avère peu différente de celle des fourrages secs. Ils confirment que l'essentiel (en fréquence et en concentration) de la contamination est localisé dans la périphérie des silos. Ces résultats montrent également que dans un ensilage donné, sous réserve qu'il ait été correctement confectionné, la contamination du fourrage est localisée de manière très ponctuelle et n'est généralement détectée que très sporadiquement au cours de son utilisation. Cette observation est rassurante : de fait, seule une infime quantité du fourrage conservé est contaminée. Mais cela pose cependant problème : compte tenu de son caractère rare et aléatoire, il semble difficile d'envisager des mesures simples et efficaces de surveillance et de contrôle de cette contamination par les producteurs.

Cette étude a été réalisée dans le cadre du programme Aliment Qualité Sécurité 2000 et a bénéficié du soutien financier du MAAPAR et de l'ONILAIT. Nous remercions vivement les éleveurs et les techniciens des organismes professionnels agricoles et des entreprises laitières qui y ont participé.

Corrot G., Champouillon M., Clamen E., 1998. Fourrages, 156, 411-429.

Fenlon D.R., 1985. J. Appl. Bacteriol, 59, 537-543

Fenlon D.R., 1986. Grass Forage Sci, 41, 373-378

Fenlon D.R., Wilson J., Weddel J.R., 1989. Grass Forage Sci., 44, 97-100.

Fenlon D.R., 1989. Microbiol. Alim. Nutrition. 7, 165-169.

Fenlon D.R., Wilson J, Donachie W., 1995. In proceedings of the XII International Symposium on Problems of Listeriosis. Perth, Western Australia, 153-156

Fenlon D.R., Wilson J., Donalchie W., 1996. J. Appl. Bacteriol. 81, 641-650.

Gronstol H., 1979. Acta Vet. Scand., 20, 417-428.

Harteiser M., 1995. Quelques observations sur l'évolution de la contamination des ensilages de maïs en *Listeria monocytogenes*. Institut de l'Élevage (non publié).

Husu J.R., Seppänen J.T., Sivela S.K., Rauramaa A.L., 1990. J. Vet. Med., B37, 268-275.

Laithier C., Heuchel V., Corrot G., Ménard J.L., 2000. Actes des 7^{èmes} Rencontres Recherches Ruminants. 347-350.

Marly S., 1993. Communication personnelle. INRA.

Meyer-Broseta S., 2002. Modélisation de la transmission de *Listeria monocytogenes* par un fromage au lait cru : appréciation quantitative et gestion du risque. Thèse de doctorat de l'Université Paris XI. 149 p.

Perry C.M., Donnelly C.W., 1990. J. Food Prot., 53, 642-647

Sanaa M., 1993. Epidémiologie de la contamination du lait à la ferme par *Listeria monocytogenes*. Thèse de Doctorat de l'université Paris XI. Faculté de médecine Paris-Sud, 207 p.

Sanaa M., Poutrel B., Ménard J.L., Serieys F., 1993. J. Dairy Sci., 76, 2891-2898

Stahl V., Garcia E., Hezard B., Fassel C., 1996. Int. J. of Food Microbiol., 44(9), 816-824.