

## LES BACTERIES DU GROUPE *BACILLUS CEREUS* DANS LA FILIÈRE DES OVOPRODUITS : PRÉVALENCE ET FACTEURS DE VARIATION

Puterflam Julie<sup>1</sup>, Jan Sophie<sup>2</sup>, Le Maréchal Caroline<sup>1</sup>, Koné Abdoulaye Zié<sup>2</sup>,  
Grosset Noël<sup>2</sup>, Gautier Michel<sup>2</sup>, et Baron Florence<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ITAVI 22400 PLOUFRAGAN

<sup>2</sup> Laboratoire de Microbiologie, Agrocampus Ouest, centre de Rennes, UMR1253 Agrocampus Ouest/INRA, Science et technologie du lait et de l'œuf, 35042 RENNES

### RÉSUMÉ

Les bactéries du groupe *Bacillus cereus* occupent une place de premier plan parmi les micro-organismes préjudiciables à la filière ovoproduits en raison de leur ubiquité et de leur capacité à résister sous forme de spore aux barèmes de pasteurisation pratiqués dans les industries (Payne et al, 1979). De plus, certaines souches du groupe sont psychrotrophes et peuvent se développer au cours du stockage des ovoproduits à faible température (Andersson et al, 1995). Or, le danger engendré par ce groupe de bactéries est de deux natures : elles ont la capacité de produire des enzymes et des toxines, respectivement susceptibles d'altérer la qualité des produits, et d'engendrer des possibilités de maladie alimentaire (Granum et al, 1996).

Dans ce contexte, cette étude a eu pour but d'apporter des données épidémiologiques en terme de prévalence de présence de bactéries du groupe *B. cereus* à deux stades de la filière ovoproduits : en élevage de poules pondeuses d'œufs de consommation et à l'issue du process de production d'entier liquide pasteurisé. Il s'agissait également d'identifier des facteurs liés à l'accroissement de cette prévalence en élevage.

Le travail a été réalisé auprès de cinquante élevages de poules pondeuses logées en cages conventionnelles au sein desquels étaient ramassés des œufs fraîchement pondus. Des échantillons d'entiers liquides étaient prélevés simultanément au sein de 6 industries de transformation.

La présence de bactéries du groupe *B. cereus* a été observée dans quarante-quatre pourcent des élevages pour les enrichissements réalisés à 37°C, dans dix pourcent des élevages pour les enrichissements réalisés à 10°C, et enfin dans la totalité des industries de transformation enquêtées. Les analyses statistiques ont mis en évidence des facteurs de variation en élevage en lien avec les pratiques d'hygiène et la présence de poussière.

### ABSTRACT

Spore-forming bacteria belonging to the *Bacillus cereus* group are recognized as causing food spoilage and/or sanitary problems due to their ability to produce enzymes and/or toxins, respectively. Since liquid egg products are usually stored at low temperature after a mild heat treatment inefficient on spores, the control of this type of bacteria is essential for egg manufacturers, especially when psychrotrophic strains are involved.

The study consisted in an inquiry about the breeding practices of fifty farms in parallel with egg collection. Samples of whole liquid egg products were simultaneously collected in six egg breaking factories. Thirty seven percent of the egg samples were positive in 44 % of the farms, for the enrichments realized at 37°C, while only 2.3 % were positive in 10 % of the farms, for the enrichments incubated at 10°C. Statistical analyses highlighted several hygiene and breeding practices as the main factors favoring contamination, while the season had no significant effect.

If we turn to the egg products, we showed that the contamination concerned all the factories with a higher occurrence of positive enrichments at 37°C (76.1 %) than at 10°C (43.7 %). A significant effect of the season was observed for the enrichment realized at 10°C with a higher occurrence at cold season than at hot season. Molecular analyses are being carried out for typing the strains in the positive enrichments. This work forms the starting point for a detailed study on the monitoring of bacteria belonging to the *Bacillus cereus* group in the sector of egg production

## 1.

**INTRODUCTION**

Les bactéries du groupe *Bacillus cereus* sont bien connues des industriels de l'agroalimentaire, notamment dans le secteur laitier. Forts producteurs d'enzymes, ces micro-organismes entraînent des altérations des produits à l'origine de pertes économiques non négligeables. De plus, certaines espèces du groupe sont pathogènes pour l'homme et les animaux et responsables de toxi-infections alimentaires. De par leur capacité de sporulation, les bactéries du groupe *B. cereus* persistent dans la matière première, même après traitement thermique. Le problème de l'élimination se pose particulièrement dans les ovoproduits car ils ne subissent que des barèmes thermiques modérés. Par ailleurs, il n'existe pas de données bibliographiques sur les risques potentiels posés par les bactéries du groupe *B. cereus* dans la filière des ovoproduits. L'enjeu est donc important pour les industriels producteurs d'ovoproduits de disposer d'éléments épidémiologiques afin de mieux évaluer le comportement de *B. cereus* et d'envisager des moyens de maîtrise pertinents. Cette étude terrain a pour objectifs d'évaluer la prévalence des bactéries du groupe *B. cereus* en élevage de poules pondeuses et en casserie ainsi que l'effet de certains facteurs de variation de cette prévalence.

**1. MATERIELS ET METHODES****1. 1. Prélèvement des échantillons**

**Prélèvements en élevage** : cinquante élevages de poules pondeuses en cage affiliés aux principaux groupements de producteurs d'œufs en Bretagne ont été visités chacun une fois entre mai 2007 et février 2008. Au sein de chaque élevage, 60 œufs étaient prélevés - soit un total de 3000 œufs coquilles analysés- de façon aléatoire dans le bâtiment (De Reu *et al.*, 2005a) au niveau des gardes à œufs et placés sur alvéoles plastique. Les œufs étaient ensuite poolés par 10 de façon à obtenir 6 échantillons par élevage testé. Les données relatives à l'environnement des animaux, aux pratiques d'élevage, à l'hygiène et à la qualité des œufs étaient recueillies au moyen d'un questionnaire rempli avec l'éleveur. Des données relatives à l'ambiance (température, hygrométrie et quantité de poussière ambiante) étaient également enregistrées.

**Prélèvements en casserie** : dans la même période six casseries du Grand-Ouest ont prélevé et fourni chacune de 28 à 36 échantillons d'entiers liquides pasteurisés produits le jour même, à raison d'un total de 111 échantillons en saison froide et 86 en saison chaude.

**1. 2. Analyses bactériologiques**

Pour chaque type d'échantillons (coquilles broyées et entiers liquides pasteurisés) une prise de 10 g était prélevée et introduite dans un sac stomacher avec 90 ml d'eau peptonnée additionnée de chlorure de lithium à 5 g/l, permettant de favoriser la croissance des bactéries à étaient incubés à deux températures : à 37°C pendant 24 heures de façon à favoriser la croissance des bactéries mésophiles, et à 10°C pendant 5 jours de façon à favoriser la croissance des bactéries psychrotrophes. L'ADN était extrait à partir des enrichissements, et la recherche des bactéries du groupe *B. cereus* était réalisée par PCR en temps réel ciblant une séquence du gène *sspE*, spécifique du groupe, à l'aide des amorces *sspE1-F* et *sspE1-R* définies par Kim *et al.* (2005) et dont les séquences sont respectivement:

5'-GAAAAAGATGAGTAAAAACAACAA-3' et CATTGTGCTTTGAATGCTAG-3', de façon à détecter la présence des bactéries du groupe.

**1. 3. Analyses statistiques**

Un élevage est considéré comme positif lorsqu'un pool de coquilles est analysé positif à 37 ou à 10°C ; il en est de même pour les casseries. Les variables générées par le questionnaire et les variables d'ambiance ont été codées en données qualitatives et croisées entre elles ainsi qu'avec les variables testées: «présence/absence de bactéries du groupe *B. cereus* à 10°C » et « présence/absence de bactéries du groupe *B. cereus* à 37°C», afin de mettre en évidence des liaisons potentielles (test de X<sup>2</sup> à 5 et à 10 %, Statview).

**2. RESULTATS ET DISCUSSION****2.1. Prévalence et facteurs de variation en élevage**

Les résultats sur les pools de coquilles d'œufs sont résumés dans le tableau 1. Sur l'ensemble des 174 échantillons enrichis à 37°C et analysés au cours de la saison chaude, seuls 14,9 % sont positifs dans 48,3 % des élevages. Sur les 126 échantillons enrichis à 37°C et analysés au cours de la saison froide, 10,3 % sont positifs dans 38,1 % des élevages. Sur l'ensemble des échantillons enrichis à 37°C (saisons chaude et froide), 13 % sont positifs dans 44% des élevages visités. Sur l'ensemble des 174 échantillons enrichis à 10°C et analysés au cours de la saison chaude, 1,7 % sont positifs dans 6,9 % des élevages. Sur les 126 échantillons enrichis à 10°C et analysés au cours de la saison froide, 3,2 % sont positifs dans 14,3 % des élevages. Sur l'ensemble des échantillons enrichis à 10°C (saisons chaude et froide), 2,3 % sont positifs dans 10 % des élevages visités.

La prévalence des bactéries du groupe *B. cereus* se

développant à 10°C étant anecdotique, l'analyse statistique des facteurs potentiels de variation de cette prévalence en élevage ne sera présentée que pour les résultats obtenus à 37°C (tableaux 2, 3).

Contrairement aux résultats attendus, la saison ne constitue par un facteur de variation de la prévalence de contamination dans les élevages. Les facteurs de variation s'inscrivent en revanche dans deux catégories de flux : la poussière ambiante et les vecteurs de contamination croisée, en cohérence avec les sources de contamination par les bactéries du groupe *B. cereus* citées par la littérature.

**Poussière ambiante :** les résultats indiquent que la présence de poussière n'est pas significativement liée avec le risque de contamination. Cependant, lorsque le seuil de poussière dans le bâtiment est supérieur à 0,002 mg/m<sup>3</sup>, le risque de contamination par les bactéries du groupe *B. cereus* est près de deux fois plus élevé (tableau 3). Selon plusieurs auteurs (De Reu *et al.*, 2006 ; Lyngtveit et Eduard, 1997) la poussière est un vecteur de transport des bactéries associée à la contamination de la coquille. Ainsi, la forte fréquence d'évacuation des fientes et l'absence de vidange des mangeoires, mis en évidence en tant que facteurs de risque, sont potentiellement liés à la teneur du bâtiment en poussière ambiante. Ces résultats vont dans le sens des sources de poussières citées dans la littérature et qui comprennent les fientes, le sol et l'aliment (De Reu *et al.*, 2005 b ; Lyngtveit, 1992). Le brassage des fientes peut être responsable de la dispersion des microorganismes dans l'environnement du bâtiment et notamment sur la coquille des œufs. L'absence de vidange des mangeoires peut, quant à elle, peut engendrer une accumulation de poussière au niveau de l'aliment, responsable de la persistance des bactéries du groupe *B. cereus*.

**Vecteur de contamination croisée :** le fait que le personnel qui s'occupe de l'élevage travaille dans un autre bâtiment constitue un facteur de risque multipliant le risque de contamination par deux (tableau 2). Selon Huneau-Salaün *et al.* (2005), le vecteur principal de contamination de l'élevage est l'homme qui contribue à introduire la bactérie depuis l'environnement et à la disséminer d'un bâtiment à l'autre. Ce résultat est par ailleurs confirmé par le fait que la propreté du sas soit un facteur protecteur réduisant le risque de contamination de moitié (tableau 3). D'où l'importance du sas sanitaire qui réduit la pression de contamination liée au personnel, surtout lorsque celui-ci évolue dans un environnement à forte densité de bâtiments augmentant le risque de contamination.

## 2. 2. Prévalence dans les casseries

Les résultats dans les ovoproduits (entiers liquides pasteurisés) sont résumés dans le tableau 4. Il apparaît que toutes les casseries sont concernées par la contamination, quelle que soit la température d'enrichissement. Sur l'ensemble des 111 échantillons enrichis à 37°C et analysés au cours de la saison chaude, 78,4 % sont positifs. Sur l'ensemble des 86 échantillons enrichis à 37°C et analysés au cours de la saison froide, 73,3 % sont positifs. Au total (saisons chaude et froide cumulées), 76,1 % des échantillons d'ovoproduits enrichis à 37°C sont positifs. Sur l'ensemble des 111 échantillons enrichis à 10°C et analysés au cours de la saison chaude, 32,4 % sont positifs. Sur l'ensemble des 86 échantillons enrichis à 10°C et analysés au cours de la saison froide, 58,1 % sont positifs. Au total (saisons chaude et froide cumulées), 43,7 % des échantillons d'ovoproduits enrichis à 10°C sont positifs.

## CONCLUSION

Les résultats de cette étude indiquent que les bactéries du groupe *B. cereus* sont présentes au sein de la filière œufs et concernent près de la moitié des élevages enquêtés et la totalité des industries de transformation testées. Il semble donc que, si la contamination initiale des œufs coquilles est issue de l'environnement de l'élevage, elle est accrue jusqu'à la transformation. Ces résultats sont accord avec ceux de Te Giffel *et al.* (1995) indiquant que les bactéries du groupe *B. cereus* peuvent être issues de l'élevage ou de recontaminations pendant le processus de transformation des œufs. Les résultats indiquent par ailleurs l'importance de maîtriser la qualité microbiologique de la matière première *via* les pratiques et l'environnement d'élevage - hygiène dans le bâtiment, qualité de l'aliment, limitation des actions dégageant de la poussière comme la manipulation des fientes-. Cette étude constitue le point de départ d'un travail global dans la prévention des bactéries du groupe *B. cereus*, dont l'étape suivante visera à étudier la cinétique de contamination au niveau des étapes intermédiaires au ramassage et à la transformation : stockage, conditionnement, transport. Il serait par ailleurs intéressant lors d'une étude complémentaire de quantifier les bactéries détectées et d'identifier la proportion des différentes espèces du groupe en les qualifiant par rapport à leurs propriétés pathogènes pour l'homme ainsi qu'à leurs propriétés d'altération des produits.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Andersson, A., Rönner, U., granum, P. E. 1995. What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*? International Journal of Food Microbiology. 28: 145-155.
- De Reu, K., Grijdpeerdt, K., Heyndrickx, M., Zoons, K., De Baere, K., Uyttendaele, M., Debevere, J., Herman, L. 2005a. Bacterial eggshell contamination in conventional cages, furnished cages and aviary housing systems for laying hens. British Poultry Science. 46 (2) : 149-155.
- De Reu, K., Grijdpeerdt, K., Heyndrickx, M., Uyttendaele, Herman, L. 2005b. The use of total aerobic and Gram-negative flora for quality assurance in the production chain of consumption eggs. Food Control. 16 : 147-155.
- De Reu, K., Grijdpeerdt, K., heyndrickx, M. Uyttendaele, M., Debevere, J., Herman, L. 2006. Bacteria shell contamination in the egg collection of different housing systems for laying hens. British Poultry Science. 47 : 163-172.
- Granum, P. E. A., Andersson, A. Gayther, C., Te Giffel, M., Larsen, H., Lund, T., O'Sullivan, K. 1996. Evidence for a further enterotoxin complex produced by *B. cereus*. FEMS Microbiol. Lett. 141: 145-149.
- Griffiths, M. W., Phillips, J. D. 1990. Incidence, source and some properties of psychotropic *Bacillus* found in raw and pasteurized milk. J. Soc. Dairy Technol. 43 : 62-66.
- Huneau-Salaün, A., La Bouquin, S., Petetin, I., Balaine, L., Eono, F. 2005. Etude sur la décontamination des élevages de poules pondeuses au sol : volet bactériologique. Sciences et Techniques Avicoles : 51.
- Kim K, Seo J, Wheeler K, Park C, Kim D, Park S, Kim W, Chung SI, Leighton T. 2005. Rapid genotypic detection of *Bacillus anthracis* and the *Bacillus cereus* group by multiplex real-time PCR melting curve analysis. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 43 (2) : 301-310.
- Lyngtveit, T. 1992. Dust measurement and work studies in hen houses with compact cages and with aviaries. ITF report. Nr. 29 (Aas, Norges landbrukshoegskole, Institut for tekniske Fag).
- Lyngtveit, T., Eduard, W. 1997. Reduction of dust exposure by negative air ionisation. Annals of Agricultural and Environmental Medicine. 4 : 229-232.
- Payne, J., Gooch, J. E. T., Barnes, E. M. 1979. Heat-resistant bacteria in pasteurized egg products. Poultry Sci. 49: 578-585.
- Shafi, R., Cotterill, O. J., Nichols, M. C. 1970. Microbial flora of commercially pasteurized eggs products. Poultry Sci. 49 : 578-585.
- Slaghuis, B. A., Te Giffel, M. C., Beumer, R. R., Andre, G. 1997. Effect of pasteurizing on the incidence of *Bacillus cereus* spores in raw milk. Int. Dairy J. 7: 201-205.
- Te Giffel, M. C., Beumer, R. R., Bonestroo, M. H., Rombouts, F. M. 1995. Occurrence and characterization of psychotropic *Bacillus cereus* on farms in the Netherlands. Neth. Milk dairy J. 49 : 125-138.

**Tableau 1.** Pourcentage de pools de coquilles d'œufs et d'élevages déclarés positifs pour la recherche des bactéries du groupe *B. cereus* après enrichissement à 37°C et à 10°C.

Enrichissement à 37°C		
Saison	Pourcentage de pools positifs	Pourcentage de élevages positifs
Chaude	14,9 % (26/174)	48,3 % (14/29)
Froide	10,3 % (13/126)	38,1 % (8/21)
Total	13,0 % (39/300)	44,0 % (22/50)
Enrichissement à 10°C		
Saison	Pourcentage de pools positifs	Pourcentage de élevages positifs
Chaude	1,7 % (3/174)	6,9% (2/29)
Froide	3,2 % (4/126)	14,3% (3/21)
Total	2,3 % (7/300)	10% (5/50)

**Tableau 2.** Facteurs liés à la présence des bactéries du groupe *B. cereus* en élevage (alpha=5 %)

Variable	ddl (a)	p (b)	Modalité	Nombre d' élevages positifs	Nombre d' élevages négatifs
Fréquence évacuation fientes	1	0,0017	Une fois/j	19	12
			Une fois/semaine	3	16
Personnel dans autre bâtiment	1	0,023	Oui	16	13
			Non	4	14
Absence de vidange des mangeoires	1	0,04	Oui	3	11
			Non	19	17
Poulettes du même lot	1	0,045	Oui	14	10
			Non	6	15
Désinfection du silo	1	0,07	Oui	12	22
			Non	10	6
Poussière	1	0,1	≥0,02 mg/m <sup>3</sup>	9	16
			<0,02 mg/m <sup>3</sup>	12	8
Propreté du sas	1	0,1	Non	12	22
			Oui	9	6

(a) Nombre de degrés de liberté, (b) Significativité du paramètre

**Tableau 3.** Nombre d'échantillons d'ovoproduits (entiers pasteurisés) déclarés positifs pour la recherche des bactéries du groupe *B. cereus* après enrichissements à 37°C et à 10°C.

Enrichissement à 37°C		
Saison	Pourcentage d'échantillons positifs	Pourcentage de casseries positives
Chaude	78,4 (87/111)	100 (6/6)
Froide	73,3 (63/86)	100 (6/6)
Total	76,1 (150/197)	100 (12/12)
Enrichissement à 10°C		
Saison	Pourcentage d'échantillons positifs	Pourcentage de casseries positives
Chaude	32,4 (36/111)	100 (6/6)
Froide	58,1 (50/86)	100 (6/6)
Total	43,7 (86/197)	100 (12/12)