



La maîtrise de la contamination des produits laitiers par *Staphylococcus aureus* est un enjeu économique et sanitaire pour l'ensemble des filières au lait cru, notamment caprine. Malgré les travaux réalisés dans ce domaine depuis de nombreuses années, les méthodes et outils mis à la disposition des producteurs ne permettent pas d'assurer la maîtrise des risques de contamination des fromages et, consécutivement, des risques d'intoxication humaine due à la production par ces bactéries d'entérotoxines (protéines thermostables cf. L'égide 39).

La piste de travail qui a été adoptée dans ce projet, consiste à tirer partie de la diversité microbienne (écosystèmes) des laits pour garantir la qualité sanitaire des fromages de chèvre tout en préservant leurs caractéristiques sensorielles. Le projet ACTA-ACTIA également financé par l'Office de l'Élevage, réalisé dans ce sens et présenté dans L'égide 36, a été coordonné par l'Institut de l'Élevage (Renée de Crémoux). Il est désormais achevé. Les principaux résultats obtenus dans les 4 volets de l'étude sont synthétisés dans cette fiche.

Volet 1 : Appréciation des risques de contamination par *S. aureus* dans le lait et les fromages

Analyse des données laïteries de 2001 à 2005 réalisée par l'Institut de l'Élevage

Les laits de citernes (ou de tournées) sont constitués du mélange d'au moins une dizaine de laits de troupeaux (ou tanks). Si une citerne est positive (*S. aureus* > 500 ufc/ml), les laits de troupeaux sont à leur tour analysés.

Niveaux de contamination des laits de citerne positives (703 données sur 5 ans sur le bassin Centre-Ouest) : 33 % sont < 10³ ufc/ml et 3 à 8,6 % (selon l'année) sont > 10⁴ ufc/ml.

Niveaux de contamination des laits de troupeaux dans ces citernes : en moyenne 31,5% de laits de tank sont peu ou pas contaminés (10 ufc/ml) et 9,1% de laits de tank sont > 10³ ufc/ml, soit 2 ou 3 laits de tank fortement contaminés par citerne positive.

Évolution de la contamination des laits de troupeaux contrôlés : moins de 2% sont systématiquement peu contaminés (<10 ufc/ml), 6,9 à 10,3% ne présentent aucun résultat supérieur à 10² ufc/ml. Par ailleurs, il est rarissime (<0,5%) que de mauvais résultats (> 10³ ufc/ml) se maintiennent en dehors des périodes les plus à risques (début et fin de lactation).

Traçabilité des souches

La fabrication de fromages de type Banon (réalisée à 34-36 °C avec peu d'acidification) est une technologie à risque en terme de croissance de *S. aureus* (comparée aux fabrications de fromages lactiques de type Ste Maure et de Pélardon). En effet, 16,7 % des fromages Banon fabriqués étaient non conformes (*S. aureus* > 10⁵ ufc/g) (N=16). Parmi ceux-ci, 37,5 % ont néanmoins été fabriqués à partir de laits peu ou pas contaminés (dénombrements 10 ufc/ml). L'existence de sources secondaires de contamination semblait probable ce qui

nécessitait l'étude de la traçabilité des souches. Celles-ci ont donc été prélevées dans : lait, fromages Banon, animaux, trayeur, transformateur et environnement de la traite puis typées par MLVA (Multi Locus Variant Analysis = analyse de répétition en tandem en nombre variable, amplification PCR). La prévalence des infections intra-mammaires occasionnées par *S. aureus* est de 2,8% en moyenne, le portage nasal et sur les mains des producteurs (trayeurs ou fromagers) est de 28,6% et 9,5% respectivement. Moins d'1/3 des profils de souches du lait sont identiques à ceux de souches de lait de chèvres excrétrices ; cela indique la présence de contaminations environnementales et le repérage des chèvres excrétrices n'est donc pas toujours suffisant. Par ailleurs, 57% des profils sont communs aux laits de tank et aux fromages, la contamination des fromages fait donc le plus souvent suite à celle du lait de tank. Parmi les souches isolées, 80,3% possédaient le gène codant pour l'entérotoxine de type C. Cependant, parmi les 41 fromages Banon où la population de *S. aureus* était >10⁴ ufc/g, aucune entérotoxine n'a été retrouvée, même pour des fromages à 10⁶ ufc/g.

◀ Concentrations d'anticorps élevées permettant de suspecter la présence d'une infection

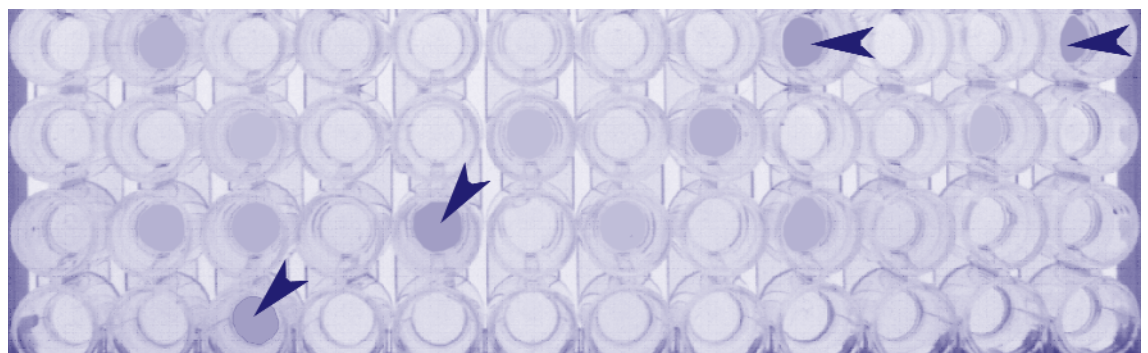


Figure 1: Plaque ELISA après addition de la solution d'arrêt de la réaction enzymatique en vue de la mesure des densités optiques

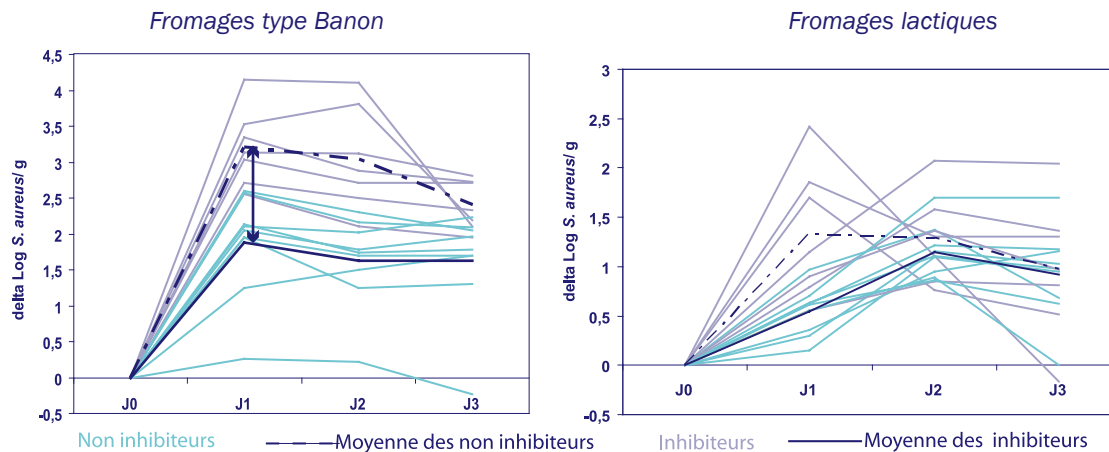


Figure 2: Croissance de *S. aureus* selon la technologie fromagère et le potentiel inhibiteur des laits de troupeaux (inoculation à 10^2 ufc/ml avec une souche entérotoxigène de type C)

Volet 2 : Mise au point d'un test ELISA

Les prélèvements ont été réalisés dans 13 exploitations ayant eu des problèmes *S. aureus* dans le lait et/ou les fromages (soit 566 chèvres en lactation dont 50 excrétrices de *S. aureus*). Le test, basé sur une réaction antigène/anticorps et mis au point par l'INRA de Nouzilly, permet d'obtenir, par exploitation, une sensibilité de 84% (réellement positifs détectés + par ELISA) et une spécificité de 83% (réellement négatifs détectés - par ELISA). Ces résultats intéressants nécessitent encore une validation terrain.

Volet 3 : Étude de l'évolution en station expérimentale des écosystèmes microbiens des laits et des fromages

L'évolution des flores microbiennes, suivie par l'INRA d'Aurillac sur le troupeau du Pradel, varie au cours de la lactation, en relation avec les types d'alimentation (chèvrerie en hiver avec luzerne déshydratée, pâturage sur graminées au printemps, chèvrerie en été avec luzerne déshydratée avec possibilité de pâturage sur légumineuse, pâturage sur graminées + luzerne déshydratée à l'automne). L'augmentation progressive des flores coliformes, staphylocoques à coagulase positive, lactobacilles mésophiles est associée à une diminution des Gram -, dont les *Pseudomonas*. Parallèlement au rôle que peuvent avoir les écosystèmes microbiens sur l'inhibition de la croissance de *S.*

aureus, il a été jugé intéressant de suivre des molécules inhibitrices naturellement présentes dans le lait cru telles que la lactoferrine et le système lactopéroxydase (= lactopéroxydase/thiocyanate/ H_2O_2) (dosés par l'INRA de Poligny). Ainsi, le potentiel antimicrobien le plus important lié au système lactopéroxydase pourrait se situer aux périodes "chèvrerie d'hiver" et "pâturage sur graminées" où la concentration en thiocyanate est la plus élevée (et quantité de lactopéroxydase non limitante). L'augmentation des teneurs en lactoferrine était en revanche graduelle au cours de la lactation.

Volet 4 : Recherche et caractérisation d'écosystèmes microbiens laitiers inhibiteurs de *S. aureus*.

Dans le cadre de ce 4ème volet, des laits dits "inhibiteurs" avaient été repérés grâce à un test de laboratoire décrit dans L'égide n° 45 et collectés afin de réaliser des fabrications fromagères à l'ITPLC et au Centre fromager de Carmejane (devenus tous les deux Actilait). Les principales conclusions relatives à ce volet technologique sont :

- L'existence de laits limitant naturellement la croissance de *S. aureus* en fabrications de type lactique et type Banon : 1 à 3 log de croissance en moins (au pic de population en *S. aureus* maximum) dans ces laits. Ceci permet d'être sous le seuil réglementaire de 10^5 ufc/g (figure 2) à partir duquel une recherche d'entérotoxines est déclenchée selon la réglementation en vigueur (règlement CE n° 2073/2005). Ce potentiel s'observe également de façon très intéressante pour des fabrications de type Banon réalisées avec très peu de ferments;

- Un potentiel susceptible d'évoluer d'une lactation à l'autre (évolution des écosystèmes microbiens liée au renouvellement des troupeaux caprins ?);
- Un caractère inhibiteur non systématiquement lié à la capacité acidifiante;
- La mise au point d'un test de laboratoire qui permet une appréciation qualitative du potentiel inhibiteur et donc une classification des laits;
- Un probable effet souche et seuil avec notamment la disparition de l'effet inhibiteur avec un inoculum de 1000 ufc/ml et donc la nécessité de maintenir la surveillance sanitaire en amont.

Pour ce qui est des inhibiteurs naturels, sur les laits du Centre Fromager de Carmejane en 2004 uniquement, les teneurs moyennes en lactoferrine étaient supérieures dans les laits inhibiteurs (en moyenne 871 μ g/ml contre 367). En revanche, aucune différence n'a été observée pour le système lactopéroxydase. L'étude des écosystèmes microbiens a, quant à elle, montré des différences de composition en levures et lactocoques entre les laits inhibiteurs et non inhibiteurs du centre de Carmejane. La piste des lactocoques a été approfondie notamment par la recherche d'espèces minoritaires telles que *Lactococcus garvieae*. L'analyse en PCR quantitative réalisée ultérieurement par l'INRA d'Aurillac a montré que 14% de l'ensemble des gels de laits inhibiteurs issus des tests de laboratoire contenaient *Lactococcus garvieae*.

Le travail réalisé tant au niveau de la production que de la transformation ouvre de nombreuses perspectives sur le plan de la maîtrise de la contamination par *S. aureus* mais nécessite également de poursuivre l'investigation sur les écosystèmes.

Renée de CRÉMOUX, Ketsia RAYNAL-LJUTOVAC

