



les staphylocoques à coagulase négative dans l'écosystème des salaisons

Stephanie Corbiere Morot-Bizot

► To cite this version:

Stephanie Corbiere Morot-Bizot. les staphylocoques à coagulase négative dans l'écosystème des salaisons. Biochimie [q-bio.BM]. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2006. Français. NNT : . tel-00088403

HAL Id: tel-00088403

<https://theses.hal.science/tel-00088403>

Submitted on 3 Oct 2006

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE D'Auvergne
N° DU : 1660

UNIVERSITE BLAISE PASCAL
Année 2006

ECOLE DOCTORALE
DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE
N° d'ordre : 439

Thèse
pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE BLAISE PASCAL
Discipline : Sciences des Aliments
Présentée et soutenue publiquement par

Stéphanie Corbière Morot-Bizot

le 7 Juillet 2006

**Les staphylocoques à coagulase négative dans
l'écosystème des salaisons**

Président	M. J.B. Gros - Professeur, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand II
Rapporteurs	Mme M. Zagorec - Directrice de Recherches, INRA, Jouy-en-Josas Mme A. Thierry - Habilitée à Diriger des Recherches, INRA, Rennes
Membres	M. G. Fonty - Professeur, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand II M. E. Beuvier - Ingénieur de Recherches, INRA, Poligny Dijon Mme S. Leroy - Ingénieur de Recherches, INRA, Clermont-Ferrand Theix
Directrice de thèse	Mme R. Talon - Directrice de Recherches, INRA, Clermont-Ferrand Theix

Unité Microbiologie - Equipe Qualité et Sécurité des Aliments
Institut National de la Recherche Agronomique - Clermont-Ferrand - Theix

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au sein de l'équipe « Qualité et Sécurité Alimentaire » de l'unité Microbiologie de l'INRA de Clermont-Ferrand-Theix.

Je tiens à remercier,

Madame Régine Talon, Directrice de recherche de l'équipe « Qualité et Sécurité Alimentaire » et directrice de cette thèse, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire, m'avoir donné sa confiance pour la réalisation de ce sujet et pour son soutien.

Madame Sabine Leroy, Ingénieur de recherche au sein de l'équipe « Qualité et Sécurité Alimentaire », qui a co-encadré ce travail. Je la remercie pour avoir accepté de participer à ce jury, et surtout pour son infailible disponibilité et pour ses nombreux encouragements.

Monsieur Jean-Bernard Gros, Professeur à l'Université Blaise Pascal de Clermont-Ferrand, pour avoir bien voulu présider le jury de soutenance.

Madame Monique Zagorec, Directrice de recherche de l'unité « Flore Lactique et Environnement Carné » de l'INRA de Jouy-en-Josas, et Madame Anne Thierry, Chargée de recherche au sein de l'unité « Science et technologie du lait et de l'œuf » de l'INRA de Rennes, de m'avoir fait l'honneur d'examiner ce travail et de participer à ce jury en qualité de rapporteurs.

Monsieur Gérard Fonty, Professeur à l'Université Blaise Pascal et Directeur de recherche de l'équipe « Biodiversité microbienne et fonctionnement des écosystèmes aquatiques » au sein du laboratoire « Biologie des Protistes » UMR CNRS d'Aubière, et Monsieur Eric Beuvier, Ingénieur de recherche au sein de l'unité « Technologie et analyses laitières » de l'INRA de Poligny, d'avoir accepté de siéger à ce jury.

J'adresse mes plus sincères remerciements à Marie-Claire Debote et Jean-Paul Chacornac pour leur bonne humeur contagieuse et pour leur soutien technique, dans toutes les circonstances. Je garderai un souvenir impérissable des campagnes d'échantillonnages qui étaient tellement matinales mais tellement agréables...

Je ne saurais oublier Emilie Dordet-Frisoni, mon amie, qui a partagé avec moi toutes les joies et les galères de thèse, et avec qui j'ai bien su mettre en pratique l'adage « je sers la science et c'est ma joie » !

Je remercie aussi Brigitte Duclos, qui a été une aide précieuse en informatique, qui m'a aidée à mettre en forme ce manuscrit, et dont je regretterai la bonne humeur communicative.

Je tiens à remercier l'ensemble du personnel du laboratoire « Qualité et Sécurité Alimentaire », pour la sympathie et pour l'ambiance chaleureuse qui y règne.

A Laurence, mon amie de longue date, qui m'a toujours encouragée et soutenue dans les moments difficiles.

Je n'oublie pas non plus mes amis Stéphane et Carine pour leur gentillesse et tous les moments que nous avons partagés.

J'adresse une pensée à tous les post-doctorants et thésards que j'ai cotôysés durant ces années de thèse, Philippe, Stella, Emilie...

Pour terminer, je remercie de tout mon cœur toute ma petite famille. Mes parents, qui ont toujours cru en moi. Mes enfants, Amandine et Benjamin, mes petits oursons de début et de fin de thèse, qui illuminent mes journées en toutes circonstances. A l'homme de ma vie, Cédric, qui a su m'encourager à chaque instant et qui n'a jamais douté de moi, même dans les moments difficiles.

Merci à tous.

REMERCIEMENTS	1
INTRODUCTION	6
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	9
- CHAPITRE I - LES STAPHYLOCOQUES A COAGULASE NEGATIVE : TAXONOMIE ET IDENTIFICATION.....	10
1 - TAXONOMIE.....	10
1-1. Le genre <i>Staphylococcus</i>	11
1-2. La classification des espèces : la différenciation des staphylocoques à coagulase positive et des staphylocoques à coagulase négative	12
2 - L'IDENTIFICATION DES STAPHYLOCOQUES A COAGULASE NEGATIVE (SCN)	13
2-1. Les méthodes phénotypiques	13
2-2. Les méthodes moléculaires	14
2-2.1. Les techniques basées sur la PCR (« Polymerase Chain Reaction »).....	14
2-2.1.1. Les PCR genre ou espèce- spécifiques	14
2-2.1.2. PCR multiplex	16
2-2.1.3. PCR en temps réel	17
2-2.1.4. RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA).....	18
2-2.2. Les techniques d'analyse du polymorphisme de l'ADN	18
2-2.2.1. Analyse des profils de restriction de produits PCR	19
2-2.2.2. SSCP (single strand conformation polymorphism)	19
2-2.2.3. DGGE (« Denaturing Gradient Gel Electrophoresis ») et TTGE (« Temporal Temperature Gel Electrophoresis »).....	20
2-2.2.4. Polymorphisme de la région intergénique ADN _r 16S et ADN _r 23S (ITS-PCR).....	21
2-2.2.5. Analyse de profils de macro restriction par électrophorèse en champs pulsés (PFGE : «Pulsed Field Gel Electrophoresis»)	22
2-2.3. Séquençage de gènes	23
2-2.4. Hybridations	24
- CHAPITRE II - HABITAT DES SCN	27
1 - LES SCN ISOLES CHEZ L'HOMME	27
2 - LES SCN ISOLES CHEZ L'ANIMAL	28
3 - LES SCN ISOLES DE L'ENVIRONNEMENT ET DES ALIMENTS	28
3-1. Les SCN dans les produits laitiers	29
3-1.1. Le lait.....	29
3-1.2. Les fromages.....	30
3-2. Les SCN dans les produits carnés.....	31
3-2.1. Les matières premières carnées.....	31
3-2.2. Les produits carnés.....	31

- CHAPITRE III - ROLE DES SCN SUR LES QUALITES SENSORIELLES ET HYGIENIQUES DES ALIMENTS FERMENTES	34
1 - LES QUALITES SENSORIELLES DES ALIMENTS FERMENTES	34
1-1. La couleur	34
1-1.1. Les salaisons.....	34
1-1.2. Les fromages.....	35
1-2. La flaveur	35
1-2.1. Le métabolisme des glucides	37
1-2.1.1. Les salaisons.....	37
1-2.1.2. Les fromages	38
1-2.2. Le métabolisme des protéines.....	38
1-2.2.1. La protéolyse	39
1-2.2.1.1. Les salaisons.....	39
1-2.2.1.2. Les fromages.....	39
1-2.2.2. Le catabolisme des acides aminés	40
1-2.2.2.1. Les salaisons.....	40
1-2.2.2.2. Les fromages.....	40
1-2.3. Le métabolisme des lipides	41
1-2.3.1. La lipolyse	41
1-2.3.1.1. Les salaisons.....	41
1-2.3.1.2. Les fromages.....	42
1-2.3.2. L'oxydation des acides gras	42
1-2.3.2.1. Les salaisons.....	42
1-2.3.2.2. Les fromages.....	43
2 - ROLES SUR LES QUALITES HYGIENIQUES DES ALIMENTS	43
2-1. Risques liés à la production de toxines	43
2-2. Risques liés à la production d'amines biogènes	45
2-3. Risques liés à la résistance aux antibiotiques	47
RESULTATS.....	49
PARTIE 1 : Développement d'outils moléculaires pour l'identification des bactéries appartenant au genre <i>Staphylococcus</i> et aux espèces <i>S. xylosus</i>, <i>S. saprophyticus</i>, <i>S. epidermidis</i> et <i>S. aureus</i> (Articles 1 et 2).....	50
1 - PROBLEMATIQUE	51
2 - RESULTATS	51
Article n°1 "Development of specific PCR primers for a rapid and accurate identification of <i>Staphylococcus xylosus</i>, a species used in food fermentation".....	54
Article n°2 "Development of a multiplex PCR for the identification of <i>Staphylococcus</i> genus and four staphylococcal species isolated from food"	63

PARTIE 2 : Etude de la flore staphylococcale isolée de l'environnement et des produits d'ateliers producteurs de salaisons (Articles 3 et 4)	72
Article n°3 "Staphylococcal community of a small unit manufacturing traditional dry fermented sausages"	74
1 - PROBLEMATIQUE	75
2 - RESULTATS	75
Article n°4 "Monitoring of staphylococcal starters in two French processing plants manufacturing dry fermented sausages"	86
1 - PROBLEMATIQUE	87
2 - RESULTATS	87
DISCUSSION	96
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	103
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	107
TRAVAUX SCIENTIFIQUES	128

INTRODUCTION

La fermentation est utilisée depuis des siècles comme méthode de conservation des aliments périssables, et fut employée bien avant que l'on ne découvre les micro-organismes et leur rôle dans ce processus. Diverses matières premières peuvent être fermentées : les fruits, les céréales, le miel, les légumes, le poisson, la viande et le lait.

Avec la découverte des micro-organismes, il est devenu possible de comprendre et de contrôler la fermentation. A partir du 20^{ème} siècle, l'utilisation de ferments sélectionnés dans les industries laitières et carnées a permis de contrôler la qualité des produits et d'assurer la reproductibilité des fabrications. Les ferments employés pour ensemencher les matières premières sont généralement des mélanges bactériens, comprenant des bactéries lactiques et certaines espèces de staphylocoques à coagulase négative (SCN). Parmi ces espèces, *S. carnosus* et *S. xylosus* sont couramment employés dans la fermentation des produits carnés et *S. equorum* dans la fermentation des produits laitiers.

En parallèle à cette production maîtrisée via l'utilisation de ferments, il existe une production traditionnelle dont la fermentation est tributaire de la flore naturellement présente. Celle-ci peut provenir des matières premières, de l'environnement et des diverses manipulations au cours du procédé de fabrication. Cet écosystème est complexe, composé à la fois de flores d'intérêt technologique, d'altération et pathogènes. Le développement de procédés de nettoyage et de désinfection accompagnés de mesures d'hygiène au cours du procédé a conduit à une diminution globale de ces flores. Ceci s'est traduit par des produits avec des qualités hygiéniques améliorées mais dont la typicité sensorielle est moindre. Or la typicité des produits traditionnels fermentés est recherchée par les consommateurs. C'est pourquoi la sélection de ferments à partir de souches indigènes est un enjeu important, afin de conserver la typicité des produits, tout en répondant aux normes sanitaires.

La sélection des nouveaux ferments nécessite une bonne connaissance des flores indigènes. Quelques travaux se sont penchés sur l'identification et la compréhension du rôle des staphylocoques à coagulase négative dans la fermentation des produits carnés et laitiers. Cependant, les méthodes d'identification utilisées lors de ces travaux sont le plus souvent basées sur l'étude des caractères phénotypiques des SCN. Or, on sait actuellement que la seule identification fiable de ces bactéries passe par l'utilisation de méthodes moléculaires. Ainsi, l'image des SCN colonisant les produits fermentés est souvent biaisée par la mauvaise identification des espèces.

L'équipe de recherche « Qualité et Sécurité des Aliments » de l'unité de Microbiologie de l'INRA de Clermont-Ferrand Theix focalise ses recherches sur les SCN. Ses objectifs sont, entre autres, de maîtriser la contamination des produits et de comprendre la colonisation de l'environnement des ateliers producteurs de salaisons par les SCN et de favoriser le développement des SCN d'intérêt technologique pouvant être utilisés comme ferments pour assurer la typicité des produits. Ces études sous-entendent d'avoir une bonne connaissance des écosystèmes des ateliers de fabrication.

C'est dans le cadre de l'étude des SCN isolés d'ateliers producteurs de salaisons que ce travail de thèse a été réalisé. Ce mémoire s'articule sur une première partie consacrée à une étude bibliographique, traitant des méthodes biochimiques et moléculaires disponibles pour identifier les SCN, de leur habitat et de leur rôle dans les qualités sensorielles et hygiéniques des aliments fermentés. Dans une deuxième partie sont présentés et discutés les travaux réalisés durant cette thèse.

Les recherches ont été structurées sur deux axes principaux. La première partie centrée sur le développement d'outils moléculaires regroupe les articles 1 et 2. La deuxième porte sur la description de la flore staphylococcale isolée des produits et de l'environnement d'un atelier traditionnel (article 3) et de deux ateliers utilisant des ferments (article 4).

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

- CHAPITRE I - LES STAPHYLOCOQUES A COAGULASE NEGATIVE : TAXONOMIE ET IDENTIFICATION

1 - TAXONOMIE

Les staphylocoques ont été mis en évidence pour la première fois en 1878 dans le pus d'abcès par Koch en Allemagne. La dénomination de *Staphylococcus* a été introduite en 1883 par Ogston et provient de l'association des termes grecs *staphylê*, grappe de raisin et *kokkos*, grain. Rosenbach fut le premier, en 1884, à décrire leurs caractères culturels. La classification des staphylocoques a connu de nombreux bouleversements. Lors de la première édition en 1923 du « Bergey's Manual® of Determinative Bacteriology », les staphylocoques étaient classés dans la famille des *Streptococcaceae* puis lors de la deuxième édition en 1926, dans la famille des *Micrococcaceae*. En 1948, cette famille comprenait alors les genres *Micrococcus* et *Staphylococcus*. Ce n'est qu'en 1957 que les staphylocoques et les microcoques furent séparés sur la base de leur capacité à utiliser le glucose en anaérobiose. Cependant, ce test amena beaucoup de confusion en attribuant certaines espèces du genre *Staphylococcus* au genre *Micrococcus* (Baird-Parker, 1971 ; Pulverer, 1987). En 1974, avec les débuts de la biologie moléculaire, Baird-Parker sépare définitivement le genre *Staphylococcus* du genre *Micrococcus*, grâce à la différence du contenu en guanine et en cytosine de leur ADN: 66-75% pour *Micrococcus* et 30-39% pour *Staphylococcus*. La famille des *Micrococcaceae* était alors constituée des bactéries appartenant aux genres *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Planococcus* et *Stomatococcus* (Bascomb & Manafi, 1998). Avec l'évolution des techniques génomiques, le genre *Staphylococcus* a été reclassé avec les bactéries à Gram positif dont l'ADN présente un GC% inférieur à 55. Le GC% et la composition de la paroi sont des marqueurs robustes pour séparer le genre *Staphylococcus* des autres coques à Gram positif et à catalase positive. Ainsi, la famille

Tableau 1 : Principaux caractères distinctifs des genres *Staphylococcus*, *Micrococcus* et *Kocuria* (D'après Schleifer *et al.*, 1986 et Brun & Bes, 2000)

Caractères \ Genres		<i>Staphylococcus</i>	<i>Kocuria</i>	<i>Micrococcus</i>
Type respiratoire		AAF	A	A
Catalase		+	+	+
Oxydase		- ^a	+	+
Croissance anaérobie en milieu thioglycolate		+ ^b	-	-
Acidification du glycérol en anaérobiose		+	-	-
Acidification du glucose en anaérobiose		+	-	-
Résistance à	Lysostaphine (200 µg/ml)	S ^c	R	R
	Composé vibriostatique O/129	R	S	S
	Lysozyme (100 µg/ml)	R	R	S
	Bacitracine (0,04 U)	R	S	S
	Furazolidone (100 µg)	S	R	R
Composition de la paroi	Type de peptidoglycane	_L -Lys-Gly	_L -Lys-Ala	_L -Lys-Ala
	Acides téchoïques	Présents	Absents	Absents
GC %		30-39	66-75	69-76

A : aérobie strict ; AAF : aéro-anaérobie facultatif.

^a: *S. sciuri*, *S. lentus* et *S. vitulinus* sont positifs.

^b : croissance faible ou nulle en anaérobiose pour *S. arlettae*, *S. auricularis*, *S. sciuri*, *S. equorum*, *S. hominis*, *S. kloosii*, *S. lentus*, *S. vitulinus*

^c : *S. capitis*, *S. caprae*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. pasteurii*, *S. saprophyticus* sont faiblement sensibles ou résistants.

des *Micrococcaceae* a été remaniée et dans la seconde édition du « Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology », le genre *Staphylococcus* a été reclassé dans l'ordre des *Bacillales* et dans la famille des *Staphylococcaceae*, qui comprend aussi les genres *Gemella*, *Macrococcus* et *Salinicoccus*. Le genre *Staphylococcus* devient taxonomiquement proche des genres *Enterococcus*, *Bacillus*, *Listeria*, *Planococcus* et *Brochothrix*.

1-1. Le genre *Staphylococcus*

C'est un groupe cohérent sur le plan phylogénétique et moléculaire, d'après l'étude comparative des séquences d'ADNr 16S (Ludwig *et al.*, 1981) et d'hybridation ADN-ADN (Kloos et Schleifer, 1986).

Au niveau des caractères phénotypiques, les staphylocoques sont à Gram positif, à catalase positive, non mobiles, asporulés, habituellement non capsulés et halo-tolérants (Tableau 1). La plupart des espèces sont aéro-anaérobies facultatives, à l'exception de *S. saccharolyticus* et *S. aureus* subsp. *anaerobius* qui sont anaérobies strictes. De nombreux tests phénotypiques permettent de distinguer les bactéries appartenant au genre *Staphylococcus* des autres genres de coques à Gram positif. Notamment, cette distinction est importante entre les genres *Micrococcus*, *Kocuria* et *Staphylococcus*, du fait de leurs caractéristiques morphologiques et physiologiques proches, et des niches écologiques qu'ils ont en commun.

Le tableau 1 présente les principaux caractères phénotypiques et génotypiques qui permettent de séparer les staphylocoques des microcoques et des *Kocuria*. Ainsi, les bactéries appartenant au genre *Staphylococcus* sont séparées de celles appartenant aux genres *Micrococcus* et *Kocuria* sur la base de leur capacité à fermenter le glucose et le glycérol, et de leur sensibilité à différents antibiotiques : les staphylocoques sont résistants au composé vibriostatique O/129 et à la bacitracine tandis que les microcoques et les *Kocuria* y sont sensibles. La composition de la paroi est aussi un critère de différenciation entre ces trois genres, puisque seuls les staphylocoques possèdent une paroi composée d'acides téchoïques et d'un peptidoglycane composé de glycine. Sur des critères génotypiques, les staphylocoques se différencient par un GC% plus bas (30 à 39%) que les microcoques et les *Kocuria* qui ont un GC% compris entre 66 et 76%. Enfin, la détermination de l'activité oxydasique et de la croissance anaérobie

Tableau 2 : Classification phénotypique des espèces et sous-espèces du genre *Staphylococcus* (d'après J.P. Euzéby, 1997)

Espèces et sous-espèces à coagulase positive	Espèces et sous-espèces à coagulase négative		
	Novobiocine sensibles et à oxydase négative	Novobiocine résistantes et à oxydase négative	Novobiocine résistantes et à oxydase positive
<i>S. aureus</i> subsp. <i>anaerobius</i> <i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> <i>S. delphini</i> <i>S. hyicus</i> <i>S. intermedius</i> <i>S. lutrae</i> <i>S. schleiferi</i> subsp. <i>coagulans</i>	<i>S. auricularis</i> <i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i> <i>S. capitis</i> subsp. <i>ureolyticus</i> <i>S. caprae</i> <i>S. carnosus</i> subsp. <i>carnosus</i> <i>S. carnosus</i> subsp. <i>utilis</i> <i>S. chromogenes</i> <i>S. condimenti</i> <i>S. epidermidis</i> <i>S. felis</i> <i>S. haemolyticus</i> <i>S. hominis</i> subsp. <i>hominis</i> <i>S. lugdunensis</i> <i>S. muscae</i> <i>S. pasteurii</i> <i>S. piscifermentans</i> <i>S. saccharolyticus</i> <i>S. schleiferi</i> subsp. <i>schleiferi</i> <i>S. simulans</i> <i>S. warneri</i>	<i>S. arlettae</i> <i>S. cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i> <i>S. cohnii</i> subsp. <i>urealyticum</i> <i>S. equorum</i> subsp. <i>equorum</i> <i>S. equorum</i> subsp. <i>linens</i> <i>S. gallinarum</i> <i>S. hominis</i> subsp. <i>novobiosepticus</i> <i>S. kloosii</i> <i>S. nepalensis</i> <i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>bovis</i> <i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i> <i>S. succinus</i> subsp. <i>casei</i> <i>S. succinus</i> subsp. <i>succinus</i> <i>S. xylosus</i>	<i>S. fleurettii</i> <i>S. lentus</i> <i>S. sciuri</i> subsp. <i>carnaticus</i> <i>S. sciuri</i> subsp. <i>rodentium</i> <i>S. sciuri</i> subsp. <i>sciuri</i> <i>S. vitulinus</i>

en milieu thioglycolate fait partie des tests complémentaires mais ne constitue pas un moyen d'identification du genre *Staphylococcus* du fait de la variabilité inter-espèces.

1-2. La classification des espèces : la différenciation des staphylocoques à coagulase positive et des staphylocoques à coagulase négative

Selon le Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire (Euzéby, 1997; <http://www.bacdico.net/>), le genre *Staphylococcus* comprend actuellement 47 espèces et sous-espèces. Néanmoins, le nombre d'espèces n'a cessé d'augmenter au cours des 20 dernières années et le genre a été remanié. Ainsi, l'espèce *S. caseolyticus* isolée de produits laitiers a été reclassée dans un nouveau genre, le genre *Macrococcus* (Kloos *et al.*, 1998), qui se différencie par un GC% plus élevé (38-45%). De même, les espèces *S. pulvereri* et *S. vitulinus* ont été récemment fusionnées dans l'unique espèce *S. vitulinus* (Svec *et al.*, 2004). Enfin, une nouvelle espèce a été décrite, *S. pettenkoferi*, mais n'est pas actuellement officiellement validée (Trulzsch *et al.*, 2002).

Le critère de base de la classification des espèces de staphylocoques reste la production de coagulase libre, enzyme responsable de la coagulation des sérums humain et canin. On distingue ainsi sept espèces et sous-espèces à coagulase positive dont *S. aureus* (SCP) et quarante à coagulase négative (SCN) (Tableau 2) (Bascomb & Manafi, 1998). Les SCN sont divisés en trois groupes suivant leur sensibilité à la novobiocine et leur activité oxydasique.

On peut toutefois noter que l'espèce *S. schleiferi* constitue un cas particulier, car la sous-espèce *S. schleiferi* subsp. *coagulans* fait partie des SCP, tandis que la sous-espèce *S. schleiferi* subsp. *schleiferi* est classée dans les SCN à oxydase négative et sensibles à la novobiocine.

En outre, parmi les SCN, on trouve quelques espèces pathogènes opportunistes pour l'homme et les mammifères, telles que *S. caprae*, *S. epidermidis*, *S. hominis* et *S. saprophyticus*. Ainsi, depuis la découverte de l'implication de certaines espèces de SCN dans des infections humaines, l'identification plus précise des membres du groupe des SCN présente un intérêt majeur.

Tableau 3 : Exemples de critères phénotypiques utilisés pour la discrimination des espèces au sein des SCN (d'après Kloos et Bannerman, 1994; Freney *et al.*, 1999).

Espèces	Résistance à la Novobiocine Oxydase Ø colonies>5mm Pigments caroténoïdes				croissance								Production en aérobiose d'acide à partir de :																	Hyaluronidase Nitrate réductase Phosphatase alcaline Arginine dihydrolase Uréase Clumping factor Hémolysine Nuclease thermostable B-glucosidase B-glucuronidase B-galactosidase											
					Aérobie	Anaérobie (thioglycolate)	10% NaCl	15% NaCl	A 15°C	A 45°C	Sur source (NH ₄) ₂ SO ₄	D-xylose	L-arabinose	D-cellobiose	D-fucose	Raffinose	Salicine	Glucose	Maltose	D-mannitol	D-mannose	D-trehalose	Lactose	D-galactose	B-D-fructose	D-melezitose	D-turanose	D-ribose	Xylitol												
<i>S. arlettae</i>	+	-	+	+	+	-	N	N	N	N	N	+	+	-	+	+	N	+	+	+	+	+	D	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	N	N	N		
<i>S. auricularis</i>	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	N	-	-	-	-	-	-	D	+	-	-	+	-	+	-	D	-	-	N	D	-	D	-	-	-	-	-	-	D		
<i>S. capitis</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	N	D	-	D	-	-	-	-	-	-	-		
<i>S. capitis</i> subsp. <i>urealyticus</i>	-	-	D	D	+	+	+	N	N	N	N	-	-	-	N	+	+	+	+	-	D	N	N	N	D	N	N	N	N	D	-	N	+	-	D	-	-	-	-	-	
<i>S. caprae</i>	-	-	D	-	+	+	+	N	N	+	N	-	-	-	-	-	-	D	D	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-		
<i>S. carnosus</i>	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	N	-	-	-	-	-	-	-	+	+	D	D	D	+	-	-	N	-	N	+	+	+	-	-	-	D	-	-	+		
<i>S. chromogenes</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	N	-	-	-	-	-	-	+	D	D	+	+	+	+	+	-	D	+	-	-	+	+	+	D	-	-	+	D	-	-	
<i>S. cohnii</i>	+	-	D	-	+	D	+	D	+	D	D	-	-	-	-	-	-	D	D	D	+	-	-	+	-	-	-	D	N	-	-	-	-	-	D	-	-	-	-		
<i>S. cohnii</i> subsp. <i>urealyticus</i>	+	-	+	D	+	+	+	D	+	D	D	-	-	-	-	-	-	+	D	+	+	+	D	+	-	-	-	D	N	-	+	+	+	-	D	-	-	+	+		
<i>S. condimenti</i>	-	-	-	-	+	N	+	+	+	D	N	N	-	-	N	-	N	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	N	N	+	+	+	+	N	N	N	N	-	+	
<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	D	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	D	D	+	D	D	D	-	D	+	+	+	+	-	+	+	D	-	-	
<i>S. equorum</i>	+	-	+	-	+	-	N	N	N	-	N	+	+	+	-	-	N	+	+	+	+	+	D	+	+	+	D	+	+	-	-	+	-	+	-	D	-	N	N	N	
<i>S. felis</i>	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	N	-	-	-	N	-	-	D	-	D	+	+	+	D	+	-	N	+	-	-	+	+	+	+	-	N	+	-	-	+	
<i>S. fleurettii</i>	+	+	-	D	+	+	+	N	N	N	N	D	+	-	-	-	-	N	+	N	+	+	-	-	+	-	D	N	-	N	+	-	-	-	-	N	-	N	-	-	
<i>S. gallinarum</i>	+	-	+	D	+	+	N	N	N	+	N	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	D	+	+	+	+	+	D	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+		
<i>S. haemolyticus</i>	-	-	+	D	+	+	+	D	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	D	-	+	D	D	D	-	D	D	-	N	D	-	+	-	-	+	-	D	D	-		
<i>S. hominis</i>	+	-	-	D	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	D	D	D	+	D	D	-	-	N	D	-	D	+	-	+	-	-	-	-		
<i>S. kloosii</i>	+	-	+	D	+	-	N	N	N	N	N	-	D	-	-	+	N	-	+	+	-	+	D	+	+	+	+	+	-	-	+	-	D	-	D	-	N	N	N		
<i>S. lentus</i>	+	+	-	D	+	+	+	+	+	-	+	+	D	+	D	+	D	+	D	+	+	+	D	D	+	-	-	+	-	N	+	+	-	-	-	-	N	+	-	-	
<i>S. lugdunensis</i>	-	-	-	D	+	+	+	+	N	+	N	-	-	-	N	-	N	+	+	-	+	+	+	N	+	N	D	-	-	N	+	-	-	D	+	+	-	N	-	-	
<i>S. muscae</i>	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	N	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	N	N	N	+	-	-	-	+	-	N	N	-	
<i>S. nepalensis</i>	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	N	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	D	-	D	-	+	+	-	+	-	-	-	N	+	+	
<i>S. pasteurii</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	N	-	-	-	N	-	N	+	+	+	-	+	N	+	N	N	N	-	-	N	N	-	+	-	-	N	-	+	+	-	
<i>S. piscifermentans</i>	-	-	N	+	+	+	N	+	N	N	N	-	-	-	-	-	-	D	D	D	-	+	D	+	N	+	-	D	-	N	+	+	+	+	N	-	N	+	-	-	
<i>S. saccharolyticus</i>	-	-	-	-	-	+	N	N	+	+	N	-	-	-	N	N	N	-	-	-	+	-	-	N	+	N	N	N	-	N	+	N	+	N	-	-	N	N	N	N	
<i>S. saprophyticus</i>	+	-	+	D	+	+	+	D	+	D	D	-	-	-	-	-	+	+	D	-	+	D	-	+	-	+	-	D	N	-	-	+	+	-	-	-	D	-	D		
<i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>bovis</i>	+	-	-	+	+	+	+	+	+	D	D	-	-	-	-	-	+	+	D	-	+	-	+	+	-	+	+	D	N	+	-	+	+	-	-	-	D	-	+		
<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>schleiferi</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	N	+	N	-	-	-	N	-	N	-	-	-	+	D	-	N	+	N	-	-	-	N	+	+	-	+	+	+	N	-	D		
<i>S. sciuri</i> subsp. <i>carnaticus</i>	+	+	-	D	+	+	N	N	N	+	N	+	D	D	+	-	D	+	+	+	D	+	D	-	+	-	N	+	-	-	+	D	-	-	-	D	-	+	-	-	
<i>S. sciuri</i> subsp. <i>rodentium</i>	+	+	D	D	+	+	N	N	N	-	N	D	D	D	D	-	D	+	D	+	+	+	-	N	+	N	N	+	-	N	+	D	-	-	+	D	-	+	-	-	
<i>S. sciuri</i> subsp. <i>sciuri</i>	+	+	D	D	+	+	+	D	+	-	+	D	-	+	+	-	+	+	D	+	D	+	-	+	+	D	-	+	-	N	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	
<i>S. simulans</i>	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	D	D	+	-	+	-	-	D	-	N	+	+	+	+	-	+	-	-	D	+	
<i>S. succinus</i>	+	-	+	-	+	-	N	N	-	-	N	N	N	N	N	-	N	+	N	N	+	+	+	N	N	N	N	N	N	N	-	+	N	+	N	N	N	N	N	N	
<i>S. vitulinus</i>	+	+	-	+	+	-	N	N	N	N	N	D	-	D	N	-	-	N	-	N	-	D	N	N	N	N	-	+	N	N	+	-	N	N	-	+	D	D	N	N	
<i>S. warneri</i>	-	-	D	+	+	+	+	+	D	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	D	-	+	D	D	+	D	D	D	-	N	-	-	D	+	-	D	-	+	D	-	
<i>S. xylosus</i>	+	-	+	+	+	D	D	+	-	-	+	+	+	-	-	-	D	+	+	D	+	+	D	D	+	-	D	D	-	N	D	D	-	+	-	-	-	+	D	+	

+ : >90% de souches positives ; - : >90% de souches négatives ; D : 11-89% de souches positives ; N : test non réalisé.

2 - L'IDENTIFICATION DES STAPHYLOCOQUES A COAGULASE NEGATIVE (SCN)

2-1. Les méthodes phénotypiques

Parmi les premiers auteurs à s'intéresser aux SCN, Kloos & Bannerman (1994) et Freney *et al.* (1999) établirent des procédures standardisées pour leur identification au niveau de l'espèce. Les critères phénotypiques utilisés pour orienter l'identification incluent la résistance à la novobiocine, la recherche de l'activité oxydasique, la taille des colonies, la production de pigments caroténoïdes, les conditions de croissance et divers tests biochimiques (Tableau 3). Ces derniers comprennent la recherche de la production d'acide à partir de différents glucides et de certaines enzymes, tels que la hyaluronidase, la nitrate réductase et de l'activité hémolytique sur gélose au sang. Seuls *S. fleurettii*, *S. lentus*, *S. sciuri* et *S. vitulinus* sont oxydase positive. Toutes les espèces de staphylocoques sont capables de croître sur milieu thioglycolate en conditions anaérobies, excepté *S. arlettae*, *S. auricularis*, *S. kloosii*, *S. succinus* et *S. vitulinus*.

Ces différents tests, couplés à d'autres tests métaboliques, sont commercialisés sous forme de galeries miniaturisées. Néanmoins, du fait de leur développement initial pour des applications cliniques, ces galeries engendrent des identifications incorrectes, voire aucune interprétation possible, pour des souches de SCN isolées de l'environnement et des aliments (Blaiotta *et al.*, 2003a ; Couzinet *et al.*, 2005 ; Giammarinaro *et al.*, 2005). En effet, le biotype n'est pas une propriété stable et peut être influencé aussi bien par une variété de facteurs environnementaux que par le gain ou la perte d'un plasmide, ou encore par des mutations ponctuelles. De mauvaises identifications sont également dues au fait que les substrats qui composent la galerie ont été choisis en fonction de souches d'origine clinique impliquées dans des infections humaines, plus étudiées et connues. En outre, la taxonomie de ce groupe est difficile à établir par méthodes phénotypiques, du fait de la lenteur de croissance de certaines espèces, ce qui rend l'observation des caractéristiques morphologiques laborieuse.

Des méthodes moléculaires d'identification ont été développées pour pallier le manque de fiabilité de l'identification des SCN sur des critères uniquement phénotypiques.

Tableau 4 : Amorces PCR utilisées pour l'identification au niveau du genre et de l'espèce des staphylocoques à coagulase négative.

Amorces	Séquence 5'-3'	Cible	Spécificité	Produit (en pb)	Références
STA I	GGA ATA ACG TGA CAT ATT GTA	Région intergénique ADNr 16S-23S	Genre <i>Staphylococcus</i>	100 à 200	Forsman <i>et al.</i> , 1997
STA II	TTC ACT CGG TTT TGC TTG G				
Reverse Forward	CCT ATA AGA CTG GGA TAA CTT CGG G CTT TGA GTT TCA ACC TTG CGG TCG	<i>rrn16S</i>		791	Mason <i>et al.</i> , 2001
TstaG422 Tstag765	GGC CGT GTT GAA CGT GGT CAA ATC A TIA CCA TTT CAG TAC CTT CTG GTA A	<i>tuf</i>		370	Martineau <i>et al.</i> , 2001
ScaI ScaII	GAA CCG CAT GGT TCT GCA A CCG TCA AGG TGC GCA TAG T	<i>rrn16S</i>	<i>S. carnosus</i>	305	Gory <i>et al.</i> , 1999; Aymerich <i>et al.</i> , 2003
CarF CarR	CTT CTA ACA CCT AAT TCT GAA GA GAT TGG ATT GTC TTG GTT AGG A	<i>sodA</i>	<i>S. carnosus</i> , <i>S. condimenti</i>	195	Blaiotta <i>et al.</i> , 2005
Se 705-1 Se 705-2	ATC AAA AAG TTG GCG AAC CTT TTC A CAA AAG AGC GTG GAG AAA AGT ATC A	Non déterminée	<i>S. epidermidis</i>	124	Martineau <i>et al.</i> , 1996
STAE-EpI STAE-EpII	TCT ACG AAG ATG AGG GAT A TTT CCA CCA TAT TTT GAA TTG T	Région intergénique ADNr 16S-23S		240	Forsman <i>et al.</i> , 1997
SE F SE R	ATC AAA AAG TTG GCG AAC CTT TTC A CAA AAG AGC GTG GAG AAA AGT ATC A	Non déterminée		124	Stuhlmeier <i>et al.</i> , 2005
SdAEqF SdAEqR	GTG GAG GAC ACT TAA ACC ATT C CAA TTT ACC ATC GTT TAC AAC TAG	<i>sodA</i>	<i>S. equorum</i>	193	Blaiotta <i>et al.</i> , 2004
Sap1 Sap2	TCA AAA AGT TTT CTA AAA AAT TTA C ACG GGC GTC CAC AAA ATC AAT AGG A	Non déterminée	<i>S. saprophyticus</i>	221	Martineau <i>et al.</i> , 2000
STAS-SiI STAS-SiII	ATT CGG AAC AGT TTC GCA G ATT GTG AGT AAT CGT TTG CC	Région intergénique ADNr 16S-23S	<i>S. simulans</i>	220	Forsman <i>et al.</i> , 1997
SimF simR	ATC CTT TCA CCT AAC TCT GAA GAG GTA ATT GGG TTG TCT TGG TTT GCT	<i>sodA</i>		197	Blaiotta <i>et al.</i> , 2005
STAX-XyI STAX-XyI	TCT TTA GAA GAT GAC AGA GG TGA CTT TTA ACA CGA CGA AG	Région intergénique ADNr 16S-23S	<i>S. xylosus</i>	260	Forsman <i>et al.</i> , 1997
Sxyl FA Sxyl FB Sxyl RA Sxyl RB	AAG TCG GTT GAA AAC CCA AA AAA ATC GGC TGA AAA CCT AAA CAT TGA CAT ATT GTC TTC AG CAT TGA CAT ATT GTA TTC AG	Région intergénique ADNr 16S-23S		417/ 317/ 217	Aymerich <i>et al.</i> , 2003
XylBF XylBR	CGT CTC AAG AAG TTG AAG ACA CTC CAC CAC CAA TTG ATA CA	<i>xylB</i> (xylulokinase)		899	Blaiotta <i>et al.</i> , 2003
geh3 geh4	GTA GAA AAA GCG AAT GAA CAA C CCT GGT TGC CAA TCT TTA TAT AC	<i>gehM</i> (lipase)		358	Rantsiou <i>et al.</i> , 2005
XylF XylR	AAC GCG CAA CGT GAT AAA ATT AAT G AAC GCG CAA CAG CAA TTA CG	Non déterminée		539	Morot-Bizot <i>et al.</i> , 2003
Swa Sta2	TAG TGA AAG GCG GCT TTG CTG CCG TCA AGA TGT GCA CAG T	<i>rrn16S</i>	<i>S. warneri</i>	289	Gory <i>et al.</i> , 1999; Aymerich <i>et al.</i> , 2003

2-2. Les méthodes moléculaires

Des méthodes génotypiques basées sur la détection du polymorphisme des acides nucléiques ont été introduites en identification bactérienne. En raison de l'avènement de l'amplification génique telle que la PCR (amplification de séquence d'ADN par polymérisation en chaîne) et des progrès technologiques (séquenceurs automatiques, banques de données accessibles par Internet, acquisition et analyses informatiques de profils électrophorétiques...), ces méthodes sont de plus en plus utilisées.

2-2.1. Les techniques basées sur la PCR (« Polymerase Chain Reaction »)

Développée par Mullis *et al.* (1986), la technique PCR connaît de nombreuses applications telles que la PCR espèce ou genre- spécifiques, la PCR multiplex, la PCR quantitative (dite en temps réel) et la RAPD.

2-2.1.1. Les PCR genre ou espèce- spécifiques

Plusieurs couples d'amorces spécifiques du genre *Staphylococcus* ont été décrits dans la littérature (Tableau 4). Elles ont été déterminées à partir de gènes dont les séquences sont suffisamment conservées au sein des staphylocoques et suffisamment différentes des autres genres bactériens pour permettre une bonne discrimination. Par exemple, le gène codant les ARNr 16S (Mason *et al.*, 2001), la région intergénique entre les gènes *rrn16S* et *rrn23S* (Forsman *et al.*, 1997) ou encore le gène *tuf*, qui code le facteur d'élongation Tu (Martineau *et al.*, 2001), ont été utilisés pour développer des amorces spécifiques du genre *Staphylococcus*. Les amorces qui ciblent le gène *tuf* ont été testées avec succès sur de nombreuses espèces staphylococciques, dont 20 à coagulase négative. Néanmoins, les auteurs observèrent une très faible amplification avec *Macroccoccus caseolyticus*, espèce qui a été séparée récemment du genre *Staphylococcus*. De plus, Ah Tow & Cowan (2003) ont montré que ces amorces étaient aussi capables d'amplifier le gène *tuf* des genres *Planococcus* et *Planimicrobium*, qui ne sont toutefois pas rencontrés dans les produits alimentaires.

Dans le cas des espèces de staphylocoques à coagulase négative, peu de couples d'amorces espèce-spécifiques ont été développés. Seules sept espèces peuvent actuellement être identifiées par cette méthode : *S. carnosus*, *S. epidermidis*, *S. equorum*, *S. saprophyticus*, *S. simulans*, *S. warneri* et *S. xylosus* (Tableau 4).

Du fait de leur importante utilisation en tant que ferments dans l'industrie alimentaire, que ce soit au niveau des salaisons ou des fromages, un certain nombre de travaux rapportent le développement d'amorces spécifiques aux espèces *S. carnosus*, *S. equorum* et *S. xylosus*. Pour l'identification de l'espèce *S. carnosus*, deux couples d'amorces spécifiques sont disponibles, l'un ciblant le gène *rrn16S*, l'autre le gène *sodA*. Dans le cas de salaisons espagnoles, Aymerich *et al.* (2003) développèrent un couple d'amorces spécifiques en s'appuyant à la fois sur les séquences du *rrn16S* de cette espèce et sur la séquence des sondes ciblant ce même gène développées par Gory *et al.* (1999). Néanmoins, l'identification des SCN basée sur les séquences de l'ARNr 16S semble avoir un pouvoir discriminant limité lorsque les espèces sont phylogénétiquement très proches (Heikens *et al.*, 2005). C'est pourquoi Blaiotta *et al.* (2005) ont ciblé le gène *sodA*, codant la superoxide dismutase A, pour synthétiser des amorces spécifiques de *S. carnosus*. Cette approche s'est appuyée sur les travaux de Poyart *et al.* (2001) qui ont montré que le gène *sodA* était présent chez tous les staphylocoques à coagulase négative et que la séquence de ce gène était suffisamment divergente pour différencier chacune des espèces. Néanmoins, les amorces développées par Blaiotta *et al.* (2005) génèrent un produit PCR de 195 pb à la fois avec les espèces *S. carnosus* et *S. condimenti*, du fait de la grande similarité de séquence du gène *sodA* entre ces deux espèces. Les auteurs indiquent toutefois qu'une restriction enzymatique avec *DraI* des produits PCR permet d'obtenir des profils caractéristiques de chacune des espèces, permettant leur bonne discrimination.

Blaiotta *et al.* (2004c) se sont aussi intéressés à l'identification de l'espèce *S. equorum* isolée de produits alimentaires, et ont développé des amorces en utilisant la même approche que pour *S. carnosus*. Les auteurs démontrèrent le manque de fiabilité des méthodes phénotypiques car de nombreuses souches préalablement identifiées à *S. xylosus* se sont avérées appartenir à *S. equorum* par identification avec les amorces spécifiques de cette espèce.

Concernant l'espèce *S. xylosus*, il existe actuellement dans la littérature plusieurs couples d'amorces spécifiques décrites. Ainsi, à partir du séquençage de la région intergénique entre les ADNr 16S et 23S, des amorces ont été développées pour identifier cette espèce (Forsman *et al.*, 1997; Aymerich *et al.*, 2003). D'autres gènes ont été ciblés pour développer des amorces spécifiques de *S. xylosus*, tels que les gènes codant l'enzyme xylulokinase et la protéine de choc thermique HSP60, qui semblent bien conservés au sein de cette espèce (Blaiotta *et al.*, 2003b) et le gène de la lipase

(*gehM*) pour identifier *S. xylosus* dans les salaisons (Rantsiou *et al.*, 2005b). Enfin, d'autres amorces ont été développées suite à la caractérisation de souches de *S. xylosus* par RAPD (« Randomly Amplified Polymorphic DNA »). Ainsi lors de ce travail de thèse, nous avons isolé un fragment RAPD commun à toutes les souches de *S. xylosus* et nous avons utilisé ce fragment pour déterminer des amorces PCR spécifiques de cette espèce (Morot-Bizot *et al.*, 2003 ; cette étude).

D'autres amorces ciblant des espèces de SCN impliquées dans les pathogénies opportunistes humaines et bovines, comme *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. simulans* et *S. warneri* ont été développées. Martineau *et al.*, (1996) ont développé des amorces ciblant l'espèce *S. epidermidis* par criblage de banques d'ADN génomique, qui leur a permis d'isoler des séquences d'ADN chromosomique spécifiques pour cette espèce. Forsman *et al.* (1997) ont séquencé la région intergénique entre les ADNr 16S et 23S et développé des amorces spécifiques de *S. epidermidis*. Cela leur a permis d'identifier des souches de cette espèce isolées de mammites bovines.

Pour l'espèce *S. saprophyticus*, Martineau *et al.* (2000) ont développé un couple d'amorces spécifiques grâce à une approche par RAPD, et l'ont utilisé pour identifier des souches d'origine clinique.

Afin d'identifier les bactéries appartenant à l'espèce *S. simulans* aussi bien dans les aliments que dans les isolats cliniques, Forsman *et al.* (1997) et Blaiotta *et al.* (2005) ont respectivement ciblé la région intergénique entre les ADNr 16S et 23S et le gène *sodA* pour développer des amorces spécifiques. Enfin, dans le cas de l'espèce *S. warneri*, Aymerich *et al.* (2003) développèrent des amorces spécifiques basées sur les séquences du *rrn16S* de cette espèce et sur la séquence des sondes ciblant ce même gène (Gory *et al.*, 1999).

Les espèces pouvant être identifiées par PCR dans ces différents travaux ne représentent qu'une petite partie des espèces au sein des SCN. Récemment, des amorces spécifiques de l'espèce *S. succinus* et ciblant le gène *sodA* ont été développées (Giammarinaro, P., Talon, R., Leroy, S., communication personnelle).

2-2.1.2. PCR multiplex

La PCR multiplex est une technique de polymérisation en chaîne qui utilise plusieurs couples d'amorces dans une même réaction. Elle a l'avantage de permettre un gain de temps par rapport à une PCR qui utilise un seul couple d'amorces. Néanmoins, la difficulté réside dans l'obtention d'une bonne combinaison d'amorces et d'un

mélange réactionnel adapté, afin d'obtenir les produits d'amplification voulus. Du fait de phénomènes de compétition, cette technique est limitée par le nombre de couples d'amorces, et on peut, actuellement, utiliser cinq voire six couples maximum dans une même réaction.

Les exemples dans la littérature qui décrivent l'utilisation de la PCR multiplex concernent la caractérisation de la résistance aux antibiotiques des souches de *S. epidermidis* d'origine clinique. Ainsi, Stuhlmeier & Stuhlmeier (2003) ont appliqué la technique de PCR multiplex pour la caractérisation des souches de cette espèce résistantes à la méthicilline. De même, les travaux de Martineau *et al.* (2000) rapportent l'utilisation de trois couples d'amorces permettant de caractériser dans la même réaction les souches de *S. epidermidis* résistantes à l'oxacilline, à la gentamicine ou à l'érythromycine.

2-2.1.3. PCR en temps réel

La PCR, qu'elle soit appliquée en simplex (utilisation d'un seul couple d'amorces) ou en multiplex (de deux à six couples) est une technique fiable et sensible, mais elle reste globalement qualitative. La PCR quantitative permet d'allier la simplicité et la rapidité de la PCR avec la possibilité de quantifier les produits d'amplification obtenus (couramment nommée « PCR en temps réel »).

Dans la bibliographie, la PCR en temps réel a été utilisée comme méthode d'identification des souches cliniques de SCN, et non pour les quantifier. Ainsi, Edwards *et al.* (2001) développèrent un système original de quatre sondes couplées deux à deux et ciblant certaines régions variables de l'ADNr 16S, permettant notamment l'identification des espèces *S. cohnii*, *S. epidermidis*, *S. hominis*, *S. lugdunensis*, *S. saprophyticus*, *S. sciuri*, *S. simulans* et *S. warneri* grâce aux profils caractéristiques des courbes d'hybridation. Sur 142 souches cliniques étudiées par cette méthode, 132 ont pu être identifiées, dont 2 à *S. cohnii*, 30 à *S. epidermidis*, 17 à *S. hominis*, 10 à *S. lugdunensis*, 6 à *S. saprophyticus*, 3 à *S. sciuri*, 5 à *S. simulans* et 11 à *S. warneri*. De même, Skow *et al.* (2005) ont utilisé la même démarche pour identifier, grâce aux profils d'hybridation obtenus avec deux sondes, sept espèces de SCN : *S. capitis*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. lugdunensis*, *S. simulans* et *S. warneri*. Ces derniers ont montré la fiabilité de cette méthode puisque la majorité de leurs isolats ont été correctement identifiés, excepté pour une souche de *S. epidermidis* qui a été assignée à *S. hominis*.

Actuellement, aucune publication ne rapporte l'utilisation de la technologie de PCR en temps réel pour l'étude des staphylocoques dans des échantillons alimentaires ou environnementaux.

2-2.1.4. RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA)

Décrite par Welsh et Mc Clelland (1990) et Williams *et al.* (1990), la RAPD est une méthode basée sur l'analyse du polymorphisme des fragments d'ADN amplifiés par PCR à l'aide d'une courte amorce oligonucléotidique (généralement de 10 nucléotides). Aucune connaissance préalable de la séquence génomique des espèces à caractériser n'est nécessaire.

La RAPD est largement appliquée en taxonomie, en épidémiologie et en écologie microbienne car elle est facile à mettre en œuvre et peut donc être appliquée à un grand nombre d'échantillons. Toutefois cette méthode étant très sensible, il est indispensable de la standardiser pour assurer la reproductibilité des résultats. Rebecchi *et al.* (1998) ont caractérisé par RAPD des souches de staphylocoques isolées du saucisson sec italien et ont montré que le processus de fermentation sélectionne un nombre limité de souches de *S. xylosus* et de *S. sciuri*. Cette approche leur a permis de typer les souches et de suivre la dynamique de ces populations pendant la fabrication du saucisson. L'étude de Rossi *et al.* (2001) portant sur le typage par RAPD de souches de *S. xylosus* isolées de saucissons secs italiens naturellement fermentés a permis de révéler une large diversité au sein de cette espèce. De plus, Di Maria *et al.* (2002) ont montré par cette même technique la divergence de profils entre les souches de *S. xylosus* utilisées comme ferment et les souches indigènes retrouvées lors de la fermentation du saucisson sec. Enfin, une étude récente a mis l'accent sur l'utilité de la méthode RAPD pour une discrimination rapide des souches de SCN impliquées dans des infections transfusionnelles (Casey *et al.*, 2005).

2-2.2. Les techniques d'analyse du polymorphisme de l'ADN

Le polymorphisme du génome bactérien est une autre approche utilisée pour identifier les espèces de staphylocoques à coagulase négative. Celui-ci peut être analysé au niveau de la séquence, mais aussi au niveau du génome tout entier. Ainsi, plusieurs techniques ont été développées, comme par exemple la SSCP, la DGGE et la TTGE qui explorent le polymorphisme des ADN sous forme dénaturée (simple brin), ou encore les PCR ITS, RFLP et ARDRA qui permettent l'étude des ADN sous forme double brin

(non dénaturés). Enfin, la technique PFGE permet d'étudier le polymorphisme des génomes bactériens dans leur ensemble après une macro restriction.

2-2.2.1. Analyse des profils de restriction de produits PCR

Le polymorphisme d'ADN peut être révélé par l'analyse de profils de restriction obtenus à partir de produits PCR. L'analyse des profils de restriction des produits amplifiés pour l'étude des SCN cible principalement les opérons ribosomiaux (technique ARDRA). D'autres gènes ont été ciblés tels que le gène *gap*, qui code la glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (Yugueros *et al.*, 2001). L'analyse des profils de restriction obtenus par digestion des produits d'amplification de l'ADN ribosomal 16S a été utilisée pour identifier des souches de staphylocoques isolées de fromages à croûte lavée (Hoppe-Seyler *et al.*, 2004). Néanmoins, seules 13 espèces de staphylocoques ont été caractérisées pour valider cet outil, et il ne semble adapté qu'à l'identification des espèces les plus fréquemment rencontrées dans la flore fromagère, telles que *S. equorum* et *S. xylosus*.

2-2.2.2. SSCP (single strand conformation polymorphism)

Introduite par Noll et Collins en 1987, la SSCP, ou polymorphisme de conformation des molécules d'ADN simple brin, est une technique d'analyse par électrophorèse des produits amplifiés par PCR en conditions dénaturantes. Jusqu'à présent, la SSCP a été peu utilisée dans l'étude des populations staphylococciques.

La PCR-SSCP est capable de détecter plus de 90% des substitutions d'une base dans des fragments de 200 pb et peut être utilisée sans connaissance préalable des communautés bactériennes (Widjoatmodjo *et al.*, 1995). De plus, cette technique permet de s'affranchir de l'isolement bactérien sur milieu de culture, car l'analyse se fait directement sur extrait d'ADN total. La SSCP a été utilisée pour étudier divers écosystèmes microbiens, tels que ceux présents dans les fromages au lait cru. Ainsi, Delbes & Montel (2005) rapportent l'utilisation de cette technique à l'étude de la diversité et de la dynamique de la population staphylococcique isolée du fromage de Salers. L'utilisation de la PCR-SSCP ciblant le gène *rrn16S* leur a permis de définir des profils caractéristiques de chacune des espèces retrouvées habituellement dans les produits laitiers. Les auteurs en ont conclu que l'espèce *S. equorum* dominait la flore des laits utilisés pour la fabrication des fromages de Salers. Néanmoins, il semble que l'hétérogénéité de séquence de l'opéron *rrn16S* intra-espèce, voire la variabilité de

conformation au sein d'une même séquence de cet opéron puisse induire des erreurs d'interprétation. En outre, des différences de taille entre génomes ou des différences en nombre de copies de l'opéron *rrn16S* inter ou intra-espèces sont autant de paramètres à prendre en considération lors de l'interprétation des résultats. Par exemple, certaines souches de *S. aureus* sont porteuses de cinq copies de l'opéron *rrn16S* quand d'autres souches en portent six. C'est à l'heure actuelle, la seule étude qui porte sur l'utilisation de cette technique pour identifier les SCN.

2-2.2.3. DGGE (« Denaturing Gradient Gel Electrophoresis ») et TTGE (« Temporal Temperature Gel Electrophoresis »)

Développée par Muyzer *et al.* (1993), l'électrophorèse en gel à gradient de dénaturation (DGGE) est une technique très appliquée dans l'étude globale des écosystèmes microbiens et pour suivre leur évolution. En effet, l'avantage de cette approche, rapide à mettre en œuvre, est de pouvoir obtenir des profils électrophorétiques directement à partir de populations bactériennes hétérogènes, sans recourir à l'isolement sur milieu sélectif. Elle supprime ainsi les biais liés à la culture.

Fontana *et al.* (2005) ont appliqué la DGGE sur des produits PCR obtenus par amplification de plusieurs régions variables de l'ADN ribosomal 16S de communautés bactériennes présentes tout au long du procédé de fermentation de saucissons secs argentins. Cette technique leur a permis de discriminer efficacement les populations de bactéries lactiques de celles des SCN. Les auteurs ont identifié les espèces *S. equorum* et *S. saprophyticus*, bien que le nombre de staphylocoques isolés dans cette étude soit assez faible. Rantsiou *et al.* (2005b) ont utilisé la même démarche pour suivre l'évolution des populations microbiennes tout au long de l'affinage de saucissons secs italiens naturellement fermentés. Ces auteurs ont ainsi pu montrer que les ateliers de fabrication de salaisons ne sont pas uniquement colonisés par l'espèce *S. xylosus*, mais que les espèces *S. succinus* et *S. equorum* peuvent aussi être isolées des produits et de l'environnement de ces niches écologiques. Les travaux de Blaiotta *et al.* (2003a) allaient dans le même sens. Grâce à la combinaison de la DGGE et de l'analyse par PCR du polymorphisme de la région intergénique de l'ADNr 16S-23S, ces auteurs vont plus loin dans l'identification de la population staphylococcique. En effet, ils montrent que la flore des saucissons italiens naturellement fermentés est plus riche que ce qui était habituellement décrit dans la littérature, car ils ont réussi à identifier plusieurs espèces, telles que *S. sciuri*, *S. hominis* et *S. succinus*. Néanmoins, l'utilisation de ces

deux techniques n'a pas permis aux auteurs de différencier catégoriquement l'espèce *S. equorum* de *S. cohnii*, et *S. carnosus* de *S. schleiferi*.

L'électrophorèse en gel à gradient de température (TTGE) est une technique dont le principe est le même que pour la DGGE, si ce n'est que le gradient utilisé dans le gel lors de l'électrophorèse est un gradient de température.

A notre connaissance, une seule étude rapporte l'identification des SCN par cette méthode. Ainsi, Ogier *et al.* (2004) ont utilisé la TTGE pour obtenir une image globale des écosystèmes microbiens présents dans du lait et différents fromages. Grâce à l'établissement d'une base de données constituée des profils TTGE de souches de référence, cette technique leur a permis de confirmer la prépondérance des bactéries à bas GC%, comme les staphylocoques, dans le cœur des fromages et celle des bactéries à haut GC% à la surface. Au niveau de la flore des SCN, les espèces *S. lentus* et *S. equorum* ont été isolées du cœur des fromages Morbier et Epoisses, respectivement, mais de façon très minoritaire. Bien que la TTGE soit une technique rapide et facile à mettre en place, les auteurs insistent sur l'attention à porter lors de l'étape d'extraction des ADN car la qualité de celle-ci conditionne les résultats obtenus, surtout dans le cas des SCN qui sont parfois difficiles à lyser.

2-2.2.4. Polymorphisme de la région intergénique ADNr 16S et ADNr 23S (ITS-PCR)

L'analyse du polymorphisme de la région intergénique des gènes *rrn16S* et *rrn23S* (ITS) a été décrite comme une voie d'étude prometteuse pour l'identification des SCN (Villard *et al.*, 2000 ; Fujita *et al.*, 2005). En effet, un fort degré de divergence dans la nature et la longueur des séquences de cette région intergénique au sein des espèces du genre *Staphylococcus* a été observé (Forsman *et al.*, 1997 ; Mendoza *et al.*, 1998 ; Villard *et al.*, 2000). Néanmoins, cette technique ne fait pas l'unanimité car au travers des travaux de Couto *et al.* (2001) et de Blaiotta *et al.* (2003a), l'ITS-PCR ne semblerait pas discriminer suffisamment les différentes espèces de SCN. En effet, Couto *et al.* (2001) observèrent un polymorphisme important au sein des profils de chacune des espèces *S. caprae*, *S. haemolyticus* et *S. lugdunensis*, ainsi que de grandes similitudes entre les profils des espèces *S. carnosus*, *S. cohnii*, *S. chromogenes*, *S. equorum*, *S. gallinarum*, *S. lentus*, *S. piscifermentans*, *S. saprophyticus*, *S. vitulinus* et *S. xylosus*, rendant l'identification des espèces de SCN difficile par cette méthode. Peu d'études rapportent l'utilisation de cette technique pour l'identification des SCN isolés des

produits et environnements alimentaires. Cependant, Rossi *et al.* (2001) identifièrent 51 souches de staphylocoques isolées de saucissons secs italiens sur la seule base de trois espèces typées par cette méthode (*S. carnosus*, *S. xylosus* et *S. simulans*). A contrario, Blaiotta *et al.* (2003a) développèrent une base de données construite à partir des profils ITS de 23 espèces de staphylocoques, dont 20 SCN. Leurs résultats montrèrent que des profils ITS similaires pouvaient être partagés par différentes espèces, comme c'est le cas pour les espèces *S. cohnii*, *S. chromogenes*, *S. equorum*, *S. gallinarum*, *S. lentus*, *S. saprophyticus*, *S. succinus* et *S. xylosus*. Aux vues des difficultés rencontrées pour différencier des espèces présentant des profils ITS identiques, Blaiotta *et al.* (2003a) conclurent que cette méthode ne pouvait pas être utilisée pour discriminer de façon fiable les SCN au niveau de l'espèce.

2-2.2.5. Analyse de profils de macro restriction par électrophorèse en champs pulsés (PFGE : «Pulsed Field Gel Electrophoresis»)

L'analyse de profils de macro restriction par PFGE est une technique de typage de haute résolution qui dérive de la combinaison de deux techniques : la génération de fragments chromosomiques grâce à des enzymes de restriction à faible fréquence de coupure (en général moins de 30 sites par génome) et de la PFGE, qui est une électrophorèse en gel d'agarose sous un champ électrique pulsé, utilisée initialement en 1984 pour le caryotypage des organismes eucaryotes (Schwartz & Cantor, 1984). Le principe de la PFGE est de séparer les molécules d'ADN sous un champ électrique qui change régulièrement de direction selon un angle défini (en général 120°). Ainsi, les molécules d'ADN sont contraintes de se réorienter en permanence dans les mailles du gel, ce qui permet la séparation des grands fragments. Contrairement à l'électrophorèse unidirectionnelle, qui ne peut pas séparer les molécules d'ADN de taille supérieure à 50 kb, la PFGE peut séparer des molécules d'ADN de taille allant jusqu'à 12 Mb. Depuis les années 1990, cette technique est devenue en épidémiologie la méthode de référence pour typer des souches et ainsi déterminer les relations phylogénétiques au sein d'un groupe d'isolats bactériens. Actuellement, les critères d'interprétation utilisés pour l'analyse des profils de macro restriction sont ceux décrits par Tenover *et al.* (1995).

La technique PFGE est largement utilisée pour le typage des souches de *Staphylococcus* et en majorité pour les espèces à coagulase positive, lors d'études épidémiologiques cliniques. Snopkova *et al.* (1994) ont déterminé les relations phylogénétiques entre 20 espèces de SCN. Mounier *et al.* (2005) ont utilisé

conjointement la PFGE, la PCR d'éléments répétés et le séquençage de l'ADNr 16S pour identifier les espèces *S. epidermidis*, *S. equorum* et *S. saprophyticus* à la surface de fromages. Dans le cas d'infections nosocomiales, ayant entraîné des septicémies dues à des cathéters contaminés, la PFGE a permis de révéler l'implication des SCN (Krediet *et al.*, 2001; Dobbins *et al.*, 2005), et d'identifier les espèces responsables telles que *S. epidermidis* (Spare *et al.*, 2003). Néanmoins, bien que ce soit une technique discriminante, la PFGE permet avant tout de caractériser les souches et il est difficile d'identifier par cette méthode les espèces, du fait de l'hétérogénéité des profils des souches au sein d'une même espèce (Di Maria *et al.*, 2002). Majoritairement, la PFGE est utilisée pour déterminer l'origine clonale des souches, et permet donc de suivre la dissémination des staphylocoques dans un biotope donné. Ainsi, des souches *S. hominis*, *S. sciuri* et *S. haemolyticus* ont été pulsotypées afin de déterminer leur origine au sein de patients et de personnel médical (Chaves *et al.*, 2005; Dakic *et al.*, 2005; Raponi *et al.*, 2005). De plus, la PFGE a été utilisé pour suivre les transferts horizontaux de gènes de résistance, telles que la résistance des SCN aux ammoniums quaternaires utilisés comme désinfectants dans l'industrie alimentaire (Bjorland *et al.*, 2005).

2-2.3. Séquençage de gènes

Le genre *Staphylococcus* étant complexe et sans cesse remanié, certains auteurs se sont attachés à étudier la phylogénie et à identifier les staphylocoques grâce au séquençage de gènes. De nombreux gènes sont des cibles potentielles pour identifier les staphylocoques à coagulase négative. Le premier à avoir été ciblé fut le gène codant les ARNr 16S. Takahashi *et al.* (1997) purent, par comparaison des séquences d'ADNr 16S de 23 espèces de staphylocoques, établir 10 groupes de similarité phylogénétique. Cependant, ce gène s'avère être trop conservé au sein du genre *Staphylococcus* pour permettre une bonne discrimination entre les espèces. Une étude récente a montré que du fait du caractère conservé des séquences codant les ARN ribosomiaux, la spécificité des amorces ciblant le *rrn16S* pourrait être limitée par leur faible capacité à discriminer des espèces taxonomiquement proches, comme c'est le cas de *S. xylosus* et *S. equorum* (Heikens *et al.*, 2005).

Certaines études se sont attachées à utiliser d'autres gènes, plus pertinents pour séparer les espèces. Ainsi, le gène *hsp60*, qui code une protéine de choc thermique de 60 kDa, a été séquencé et comparé chez 40 espèces et sous-espèces de staphylocoques (Kwok *et al.*, 1999; Kwok & Chow, 2003). L'analyse phylogénétique basée sur le gène

hsp60 s'est révélée intéressante car ce gène est conservé au sein du genre *Staphylococcus* tout en présentant une bonne diversité de séquence inter-espèces, donc constitue un bon moyen de les discriminer. Drancourt & Raoult (2002) ont basé l'identification des espèces de staphylocoques sur la comparaison des séquences du gène *rpoB*, qui code pour la sous-unité beta de l'ARN polymérase. Ce gène est suffisamment divergent entre espèces pour être utilisable comme outil d'identification, et l'arbre phylogénétique qui en a résulté s'est avéré très bien corrélé avec celui construit sur la base des séquences du gène *hsp60* (Kwok *et al.*, 1999). Enfin, le gène *sodA* codant la superoxide dismutase manganèse-dépendante a été séquencé chez plusieurs espèces et sous-espèces de staphylocoques par Poyart *et al.* (2001). Ce gène présente lui aussi une grande diversité de séquence inter-espèces, et a permis l'élaboration d'une base de données de séquences *sodA* de staphylocoques de référence. Cette base de données a servi au développement de nouvelles techniques d'identification telle que la « Staph-Array », basée sur l'utilisation de sondes espèce-spécifiques (Giammarinaro *et al.*, 2005).

2-2.4. Hybridations

L'hybridation ADN-ADN est encore actuellement la méthode de référence de définition d'une espèce ou d'une sous-espèce. Il est admis que des souches ayant des valeurs d'homologie de 70% ou plus appartiennent à la même espèce (Kwok *et al.*, 1999).

Néanmoins, l'hybridation ADN-ADN n'est pas une technique adaptée à l'étude des relations phylogénétiques des micro-organismes au-delà de l'espèce à cause du haut degré de dissimilarité de séquence.

Le principe de l'hybridation est aussi applicable à des fragments d'ADN. Diverses sondes marquées peuvent être utilisées pour la détection, l'identification et le typage des bactéries. Ces sondes d'acides nucléiques reconnaissent spécifiquement un gène (gènes codant les ARN ribosomaux, gènes de virulence) ou une région présente dans leur génome. Selon leur spécificité, il est possible d'identifier des bactéries au niveau de la famille, du genre ou de l'espèce. Les sondes les plus communément utilisées ciblent les gènes codant les ARN ribosomaux, notamment les ARNr 16S et 23S. La technique correspondante est la ribotypie et a été développée par Grimont & Grimont (1986). Le haut degré de conservation des ARN ribosomaux au cours de l'évolution permet

d'utiliser cette méthode pour l'étude au niveau du genre et de l'espèce, voire des souches.

Le ribotypage a été validé pour un grand nombre d'espèces. Cette méthode est utilisée actuellement pour typer des souches de staphylocoques, qu'elles soient d'origine laitière (De Buyser *et al.*, 1989 ; Meugnier *et al.*, 1996 ; Villard *et al.*, 2000) ou d'origine clinique (Chesneau *et al.*, 2000). Probst *et al.* (1998) ont montré une hétérogénéité chez des souches de *S. carnosus* isolées de sauce soja grâce à une sonde spécifique à cette espèce, basée sur la séquence de l'ADNr 23S. Cette diversité leur a permis de décrire une nouvelle sous-espèce, *S. carnosus* subsp. *utilis*. Gory *et al.* (1999) ont développé des sondes oligonucléotidiques ciblant l'ADNr 16S pour identifier les espèces *S. carnosus*, *S. warneri* et *S. saprophyticus*. Ces sondes sont spécifiques par hybridation en dot-blot (ARN/ADN). En hybridation *in situ*, seules les sondes ciblant *S. carnosus* et *S. warneri* ont été spécifiques.

L'intérêt taxonomique de cette technique est important pour caractériser et comparer des souches appartenant à des espèces différentes.

D'autres travaux se sont attachés à développer des sondes ciblant d'autres gènes que ceux codant les ARN ribosomaux pour l'identification des staphylocoques. Par exemple, Goh *et al.* (1996) ont montré qu'une région de 600 pb du gène codant la protéine de choc thermique HSP60 isolée chez différentes espèces de staphylocoques pouvait être utilisée comme sonde spécifique d'espèce. Ainsi ils ont développé des sondes spécifiques de *S. epidermidis*, *S. lugdunensis* et *S. saprophyticus*. Leur méthode a permis par la suite d'identifier avec succès les espèces *S. sciuri*, *S. caseolyticus*, *S. hominis*, *S. warneri* et *S. capitis* (Goh *et al.*, 1997).

Les puces à ADN, qui associent sur une même surface l'utilisation d'un certain nombre de sondes spécifiques, constituent une autre voie exploitée pour identifier les SCN. Ainsi, la puce développée par Couzinet *et al.* (2005) a permis d'identifier 30 espèces appartenant au genre *Staphylococcus*, dont 23 SCN, sur la base du gène *rrn16S*. Seules les espèces *S. carnosus*, *S. lugdunensis* et *S. saprophyticus* ne purent pas être identifiées par cette méthode. Au sein de notre laboratoire, Giammarinaro *et al.* (2005) ont récemment développé une puce de type « macro array » permettant d'identifier chacune des 36 espèces du genre *Staphylococcus* actuellement décrites, dont 30 SCN (Giammarinaro *et al.*, 2005). Leur outil se base sur l'utilisation de sondes espèce-spécifiques qui ciblent le gène codant la superoxyde dismutase A (*sodA*). Cette technique a été testée avec succès sur des souches isolées aussi bien d'environnements

alimentaires que cliniques. Néanmoins, cette méthode ne permet pas de discriminer les souches au niveau sous-espèce, excepté pour les sous-espèces *S. cohnii* subsp. *cohnii* et *S. cohnii* subsp. *urealyticus*.

Tableau 5 : Origine et infections liées aux différentes espèces de SCN

ESPECES	ORIGINE	INFECTION OPPORTUNISTE	REFERENCES
<i>S. arlettae</i>	Chèvre et volailles	Non déterminée	Schleifer <i>et al.</i> , 1985
<i>S. auricularis</i>	Oreilles des singes et des hommes	Non déterminée	Kloos et schleifer, 1983
<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	Homme	Infections nosocomiales	Schleifer et Kloos, 1975
<i>S. capitis</i> subsp. <i>urealyticus</i>	Mammifères		Bannerman et Kloos, 1991
<i>S. caprae</i>	Caprins et leurs produits, hommes	Infections nosocomiales	Devriese <i>et al.</i> , 1983
<i>S. carnosus</i> subsp. <i>carnosus</i>	Produits carnés, sauce fermenté de soja	Aucune	Schleifer et Fischer, 1982
<i>S. carnosus</i> subsp. <i>utilis</i>	Sauce fermentée de soja	Non déterminée	Probst <i>et al.</i> , 1998
<i>S. chromogenes</i>	Porcs, lait de chèvre	Mammites ovines/bovines	Hajek <i>et al.</i> , 1986
<i>S. cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i>	Peau humaine	Infections nosocomiales	Schleifer et Kloos, 1975
<i>S. cohnii</i> subsp. <i>urealyticus</i>	Singes		Kloos et Wolfshohl, 1991
<i>S. condimentii</i>	Sauce de soja ou de poissons fermentés	Non déterminée	Probst <i>et al.</i> , 1998
<i>S. epidermidis</i>	Peau et muqueuses humaines	Infections nosocomiales	Pfaller et Herwaldt, 1988
<i>S. equorum</i> subsp. <i>equorum</i>	Peau de chevaux et lait de chèvre	Non déterminée	Schleifer <i>et al.</i> , 1984
<i>S. equorum</i> subsp. <i>linens</i>	Surfaces des fromages	Non déterminée	Place <i>et al.</i> , 2003a
<i>S. felis</i>	Chats	Infections cutanées	Igimi <i>et al.</i> , 1989
<i>S. fleurettii</i>	Fromages de chèvre	Non déterminée	Vernozy-Rozand <i>et al.</i> , 2000
<i>S. gallinarum</i>	Volailles, faisans	Non déterminée	Devriese <i>et al.</i> , 1983
<i>S. haemolyticus</i>	Peau des singes et des hommes	Infections nosocomiales	Schleifer et Kloos, 1975
<i>S. hominis</i> subsp. <i>hominis</i>	Sang humain	Sépticémies rares	Schleifer et Kloos, 1975
<i>S. hominis</i> subsp. <i>novobiosepticus</i>			Kloos <i>et al.</i> , 1998
<i>S. kloosii</i>	Rongeurs	Non déterminée	Schleifer <i>et al.</i> , 1984
<i>S. lentus</i>	Chèvres, porcs, moutons, poulets	Non déterminée	Schleifer <i>et al.</i> , 1983
<i>S. lugdunensis</i>	Homme	Infections nosocomiales	Freny <i>et al.</i> , 1988
<i>S. muscae</i>	Mouches vivant dans des élevages bovins	Non déterminée	Hajek <i>et al.</i> , 1992
<i>S. nepalensis</i>	Lait de chèvres népalaises	Non déterminée	Spergser <i>et al.</i> , 2003
<i>S. pasteurii</i>	Homme, animaux, légumes	Non déterminée	Chesneau <i>et al.</i> , 1993
<i>S. piscifermentans</i>	Produits fermentés à base de poisson ou de soja	Non déterminée	Tanasupawat <i>et al.</i> , 1992
<i>S. sacharolyticus</i>	Muqueuses de l'homme	Endocardites	Kilper-Balz & Schleifer, 1981
<i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i>	Homme	Infections urinaires	Schleifer et Kloos, 1975
<i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>bovis</i>	Naseaux de vaches	Non déterminée	Hajek <i>et al.</i> , 1996
<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>schleiferi</i>	Homme	Infections nosocomiales	Freny <i>et al.</i> , 1988
<i>S. sciuri</i> subsp. <i>carnaticus</i>	Rongeurs, environnement	Non déterminée	Kloos <i>et al.</i> , 1976
<i>S. sciuri</i> subsp. <i>rodentium</i>	Rongeurs, mammifères marins		
<i>S. sciuri</i> subsp. <i>sciuri</i>	Viandes de veau, bœuf, dauphin		
<i>S. simulans</i>	Peau humaine, chats, chiens, lait de chèvre	Infections nosocomiales	Schleifer et Kloos, 1975
<i>S. succinus</i> subsp. <i>succinus</i>	Ambre (St Domingue)	Non déterminée	Lambert <i>et al.</i> , 1998
<i>S. succinus</i> subsp. <i>casei</i>	Surface de fromages	Non déterminée	Place <i>et al.</i> , 2003
<i>S. vitulinus</i>	Peau et viande (bœuf, cheval, agneau, veau...)	Non déterminée	Webster <i>et al.</i> , 1994
<i>S. warneri</i>	Peau humaine	Infections nosocomiales	Schleifer et Kloos, 1975
<i>S. xylosus</i>	Peau des mammifères	Mammites	Schleifer et Kloos, 1975

- CHAPITRE II - HABITAT DES SCN

Les staphylocoques à coagulase négative sont largement répandus dans la nature et sont couramment isolés de la flore commensale cutanée, des glandes et des muqueuses des mammifères et des oiseaux (Kloos *et al.*, 1976). Ils sont parfois retrouvés dans la bouche, le sang, les glandes mammaires ainsi qu'au niveau des appareils intestinal, génital et respiratoire de ces hôtes (Nagase *et al.*, 2002). Les staphylocoques peuvent subsister dans l'environnement de leurs hôtes, comme les primates, qui constitueraient les hôtes naturels majeurs de ce genre bactérien. Certaines espèces sont isolées de divers hôtes comme *S. kloosii*, *S. pasteurii*, d'autres semblent inféodées à une espèce-hôte particulière, comme *S. felis* qui n'a été isolé que chez le chat (Kloos & Schleifer, 1986) (Tableau 5).

1 - LES SCN ISOLES CHEZ L'HOMME

Les staphylocoques représentent près de 50% des bactéries aérobies isolées sur la tête, les aisselles, les bras, les jambes et dans les narines. Ils jouent un rôle important dans l'équilibre physico-chimique de la peau et constituent une barrière contre les bactéries de la flore transitaire. Les espèces de SCN les plus fréquentes sont *S. capitis*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* et *S. hominis* (Kloos et Musselwhite, 1975). Leur distribution sur la peau n'est pas uniforme (Kloos *et al.*, 1976). Il existe des niches préférentielles qui témoignent d'une adaptation de certaines espèces aux différentes régions de la peau. Les espèces les plus exigeantes se trouvent dans les zones où se produit une sudation importante, constituant ainsi un excellent milieu de culture. *S. epidermidis* est prédominant dans les narines. *S. epidermidis* et *S. hominis* sont persistants sur la tête, les aisselles, les jambes et les bras. Le front est souvent colonisé par *S. capitis* et *S. haemolyticus*. *S. saccharolyticus* est souvent isolé de la tête et des bras et *S. auricularis* de l'oreille. Au niveau des mains se retrouvent les espèces *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* et *S. hominis* (Kloos & Schleifer, 1986).

2 - LES SCN ISOLÉS CHEZ L'ANIMAL

Chez le singe, *S. warneri* est majoritaire, tandis que *S. saprophyticus*, *S. sciuri*, *S. simulans* et *S. xylosus* sont isolés moins fréquemment (Kloos, 1980). Chez les animaux sauvages, les espèces *S. kloosii* et *S. xylosus* sont prédominantes. Chez les animaux domestiques, peu d'études sur l'écologie microbienne ont été réalisées. Cependant, les chèvres hébergent *S. lentus* et diverses espèces trouvées dans leur lait comme *S. arlettae*, *S. capitis*, *S. nepalensis*, *S. pasteurii* et *S. simulans*. Les chevaux hébergent les espèces *S. equorum* subsp. *equorum*, *S. kloosii* et *S. vitulinus*. Les bovins sont porteurs de *S. saprophyticus* subsp. *bovis*, *S. vitulinus* tandis que *S. muscae* est associé aux mouches au voisinage des bovins. Les porcins sont porteurs de *S. chromogenes*, *S. kloosii* et *S. lentus*. Les ovins hébergent *S. kloosii* et *S. lentus*. Des espèces de SCN ont aussi été caractérisées au niveau cutanéomuqueux chez des petits mammifères: écureuil (*S. kloosii*, *S. sciuri*, *S. vitulinus*), chat (*S. felis*)...(Kloos, 1980)

Les espèces résistantes à la novobiocine semblent plus fréquemment isolées dans les narines et sur la peau des animaux de ferme que chez l'homme (Devriese *et al.*, 1985). Notre connaissance de l'habitat des staphylocoques reste très incomplète car beaucoup d'espèces-hôtes animales n'ont pas encore été étudiées. De plus, l'exploration de nouvelles niches écologiques aboutit souvent à la description de nouvelles espèces (*S. nepalensis*, *S. succinus*...).

3 - LES SCN ISOLÉS DE L'ENVIRONNEMENT ET DES ALIMENTS

La plupart des SCN ont été isolés de sources environnementales très variées : terre, sable, eau, aliments, surfaces de travail, ustensiles de cuisine, vêtements, air, poussière. Par exemple, *S. succinus* subsp. *succinus* a été isolé d'ambre (Lambert *et al.*, 1998), et *S. epidermidis* et *S. saprophyticus* ont été isolés dans l'environnement d'industries alimentaires (Heir *et al.*, 1999). Il semble que les animaux, y compris les humains, soient responsables de la dissémination de ces bactéries via les squames de peaux qu'ils perdent continuellement. Ainsi, beaucoup de SCN se retrouvent dans les produits alimentaires, particulièrement ceux d'origine animale, comme les produits laitiers et carnés. De plus, par leur caractère halotolérant, les salaisons constituent une niche écologique particulièrement favorable à leur implantation. Certaines espèces ont

Tableau 6 : Espèces de staphylocoques à coagulase négative isolées des produits laitiers

Origine		Espèces	Références
Laits			
Lait de vache		<i>S. capitis</i> , <i>S. chromogenes</i> , <i>S. cohnii</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S. haemolyticus</i> , <i>S. hominis</i> , <i>S. hyicus</i> , <i>S. lentus</i> , <i>S. pasteurii</i> , <i>S. saprophyticus</i> , <i>S. simulans</i> , <i>S. warneri</i> , <i>S. xylosus</i>	Rather <i>et al.</i> , 1986; Ben Hassen <i>et al.</i> , 2002; Bjorland <i>et al.</i> , 2005
Lait de brebis		<i>S. auricularis</i> , <i>S. capitis</i> , <i>S. caprae</i> , <i>S. chromogenes</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S. equorum</i> , <i>S. haemolyticus</i> , <i>S. hominis</i> , <i>S. hyicus</i> , <i>S. lentus</i> , <i>S. simulans</i> , <i>S. xylosus</i>	Ariznabarreta <i>et al.</i> , 2002; Hariharan <i>et al.</i> , 2004
Lait de chèvre		<i>S. caprae</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S. saprophyticus</i> , <i>S. warneri</i> , <i>S. xylosus</i>	Deinhofer <i>et al.</i> , 1995 ; Bjorland <i>et al.</i> , 2005
Fromages au lait cru			
Pâte pressée non cuite	César de Cáceres	<i>S. caseolyticus</i> , <i>S. caprae</i> , <i>S. capitis</i> , <i>S. cohnii</i> , <i>S. gallinarum</i> , <i>S. lentus</i> , <i>S. saprophyticus</i> , <i>S. sciuri</i> , <i>S. xylosus</i>	Cáceres <i>et al.</i> , 1997
	Morbier	<i>S. equorum</i> , <i>S. lentus</i>	Ogier <i>et al.</i> , 2004
	Salers	<i>S. equorum</i> , <i>S. saprophyticus</i>	Delbès <i>et al.</i> , 2005
Pâte molle et croûte lavée	Différents fromages	<i>S. equorum</i> , <i>S. hominis</i> , <i>S. saprophyticus</i> , <i>S. sciuri</i> , <i>S. succinus</i> , <i>S. warneri</i>	Hoppe-Seyler <i>et al.</i> , 2004
	Durrus	<i>S. epidermidis</i>	Mounier <i>et al.</i> , 2005
Tous types		<i>S. capitis</i> , <i>S. cohnii</i> , <i>S. equorum</i> , <i>S. kloosii</i> , <i>S. saprophyticus</i> , <i>S. sciuri</i> , <i>S. vitulinus</i> , <i>S. xylosus</i>	Irlinger <i>et al.</i> , 1997
Fromages pasteurisés			
Pâte persillée	Stilton	<i>S. equorum</i>	Ercolini <i>et al.</i> , 2003
Pâte pressée non cuite	Ardrahan	<i>S. equorum</i>	Mounier <i>et al.</i> , 2005
	Millens	<i>S. equorum</i>	Mounier <i>et al.</i> , 2005
	Gubbeen	<i>S. saprophyticus</i>	Mounier <i>et al.</i> , 2005

été isolées des produits de la mer, tels que la morue fumée (*S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. saprophyticus*, *S. simulans* et *S. warneri*) et la morue salée (*S. auricularis*, *S. capitis*, *S. cohnii* et *S. sciuri*) (Rodriguez *et al.*, 1996), et des produits fermentés à base de poisson (*S. pisci fermentans*) (Tanasupawat *et al.*, 1992). D'autres SCN ont été identifiés dans des préparations culinaires à base de légumes, comme *S. condimenti* et *S. carnosus* subsp. *utilis* dans la sauce soja (Probst *et al.*, 1998) ou *S. gallinarum* dans le « miso », pâte fermentée à base de haricots (Onda *et al.*, 2003).

Néanmoins, la majorité des espèces de staphylocoques à coagulase négative retrouvées dans les aliments sont isolées des produits laitiers et carnés, qu'ils soient fermentés ou non.

3-1. Les SCN dans les produits laitiers

Bien que beaucoup d'études aient porté sur l'identification des staphylocoques à coagulase positive pour des raisons sanitaires, de plus en plus de travaux s'attachent ces dernières années à l'identification des staphylocoques à coagulase négative. C'est ainsi que la flore staphylococcace des produits laitiers s'avère être plus riche que celle précédemment décrite dans la littérature (Tableau 6).

3-1.1. Le lait

De nombreux travaux se sont intéressés aux SCN présents dans le lait des animaux de ferme, du fait de leur implication dans des pathologies telles que les mammites. Par conséquent, quelques auteurs s'attachèrent à identifier les espèces présentes dans le lait et à déterminer le lien entre espèce et réaction inflammatoire due aux mammites. Ainsi, Ariznabarreta *et al.* (2002) isolèrent du lait de brebis majoritairement *S. epidermidis* (53% des isolats) : parmi cette espèce, 24% des souches étaient impliquées dans des mammites. Les différentes espèces de SCN isolées furent classées en trois catégories : celles qui ont provoqué des inflammations importantes (*S. caprae*, *S. simulans*), celles qui ont engendré une réaction modérée (*S. capitis*, *S. epidermidis*, *S. chromogenes*, *S. haemolyticus* et *S. hominis*) et enfin les espèces qui ont induit une réaction inflammatoire transitoire (*S. lentus* et *S. xylosus*) (Ariznabarreta *et al.*, 2002). Néanmoins, pour Hariharan *et al.* (2004) qui identifièrent diverses espèces de SCN dans le lait de 50 brebis, dont *S. equorum* (espèce majoritaire), *S. xylosus* et *S. simulans*, il n'existerait pas de corrélation évidente entre les SCN isolés dans le lait et les mammites.

observées. De même, dans le lait de vaches atteintes ou non de mammites, de nombreuses espèces ont été identifiées, comme *S. capitis*, *S. chromogenes*, *S. cohnii*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. lentus*, *S. saprophyticus*, *S. simulans*, *S. warneri* et *S. xylosus* (Rather *et al.*, 1986 ; Ben Hassen *et al.*, 2003). Dans le lait de chèvres saines, de nombreuses espèces ont aussi été isolées, comme par exemple *S. caprae*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. warneri* et *S. xylosus* (Deinhofer & Pernthaner, 1995 ; Bjorland *et al.*, 2005).

3-1.2. Les fromages

Dans le cas des fromages, la flore peut être plus variée encore, comme le montre la diversité d'espèces isolées de fromages au lait cru (Tableau 6). Les SCN participent en surface à l'affinage de nombreux fromages fermiers, tels que ceux à croûte lavée (Munster, Livarot) ou à croûte fleurie (Camembert) (Irlinger *et al.*, 1997). L'analyse de la flore de surface de 25 types de fromages traditionnels français a révélé la présence de nombreuses espèces, dominées majoritairement par *S. equorum* (61% des isolats), *S. vitulinus* (13,5%) et *S. xylosus* (11%). La flore minoritaire était constituée des espèces *S. capitis*, *S. cohnii*, *S. lentus*, *S. saprophyticus* et *S. sciuri*. Dans le cas des fromages de type pâte pressée non cuite, comme par exemple le fromage de type « Cásar de Cáceres », la flore est particulièrement diversifiée, car de nombreuses espèces telles que *S. xylosus* (65% des isolats), *S. capitis*, *S. caprae*, *S. caseolyticus*, *S. cohnii*, *S. gallinarum*, *S. lentus*, *S. saprophyticus* et *S. sciuri* ont été isolées (Cáceres *et al.*, 1997). D'autres fromages à pâte pressée non cuite tels que le Morbier et le Salers possèdent une flore de surface moins diversifiée, puisque seules les espèces *S. equorum*, *S. lentus* et *S. saprophyticus* sont présentes (Ogier *et al.*, 2004 ; Delbes & Montel, 2005). Dans le cas des fromages à pâte molle et croûte lavée, l'étude de Hoppe-Seyler *et al.* (2004) montre une flore staphylococcale composée des espèces *S. equorum*, *S. hominis*, *S. saprophyticus*, *S. sciuri*, *S. succinus* et *S. warneri*, tandis que l'analyse de la flore de surface d'un fromage irlandais, le « Durrus », révèle une flore pauvre composée de l'unique espèce *S. epidermidis*, qui provenait probablement d'une contamination accidentelle lors du procédé de fabrication (Mounier *et al.*, 2005).

Ainsi, dans les fromages fabriqués à partir de lait cru, *S. equorum* semble être l'espèce la plus fréquemment isolée en surface, sans doute en raison de la saumure, qui est utilisée avant l'affinage et qui constituerait un réservoir naturel pour cette espèce (Bockelmann & Hoppe-Seyler, 2001).

Tableau 7 : Espèces de staphylocoques à coagulase négative isolées des produits carnés

Origine	Espèces	Références
Peau de poulet	<i>S. epidermidis</i> , <i>S. saprophyticus</i> , <i>S. sciuri</i>	Kawano <i>et al.</i> , 1996
Viande de bœuf	<i>S. auricularis</i> , <i>S. capitis</i> , <i>S. chromogenes</i> , <i>S. cohnii</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S. haemolyticus</i> , <i>S. hominis</i> , <i>S. lentus</i> , <i>S. saprophyticus</i> , <i>S. sciuri</i> , <i>S. warneri</i> , <i>S. xylosus</i>	Shale <i>et al.</i> , 2005
Viande de porc	<i>S. epidermidis</i> , <i>S. succinus</i>	Olsson <i>et al.</i> , 2003
Saucisses fraîches de porc	<i>S. equorum</i> , <i>S. haemolyticus</i> , <i>S. pasteurii</i> , <i>S. saprophyticus</i> , <i>S. succinus</i> , <i>S. warneri</i> , <i>S. xylosus</i>	Rantsiou <i>et al.</i> , 2005a; Cocolin <i>et al.</i> , 2004
Chorizo et Fuets	<i>S. carnosus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S. hominis</i> , <i>S. saprophyticus</i> , <i>S. xylosus</i>	Garcia-varona <i>et al.</i> , 2000; Aymerich <i>et al.</i> , 2003
Lacón	<i>S. cohnii</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S. equorum</i> , <i>S. saprophyticus</i> , <i>S. sciuri</i> , <i>S. simulans</i> , <i>S. warneri</i> , <i>S. xylosus</i>	Vilar <i>et al.</i> , 2000
Jambon cru	<i>S. equorum</i> , <i>S. capitis</i> , <i>S. gallinarum</i> , <i>S. kloosii</i> , <i>S. saprophyticus</i> , <i>S. sciuri</i> , <i>S. xylosus</i>	Cordero <i>et al.</i> , 2000
Jambon cru Ibérique	<i>S. equorum</i> , <i>S. xylosus</i>	Rodriguez <i>et al.</i> , 1994
Salamis Grecs	<i>S. cohnii</i> , <i>S. gallinarum</i> , <i>S. saprophyticus</i> , <i>S. xylosus</i>	Samelis <i>et al.</i> , 1998 ; Garcia-varona <i>et al.</i> , 2000
Salamis Italiens	<i>S. capitis</i> , <i>S. chromogenes</i> , <i>S. cohnii</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S. hominis</i> , <i>S. lentus</i> , <i>S. lugdunensis</i> , <i>S. saprophyticus</i> , <i>S. simulans</i> , <i>S. succinus</i> , <i>S. warneri</i> , <i>S. xylosus</i>	Coppola <i>et al.</i> , 2000 ; Mauriello <i>et al.</i> , 2004
Saucissons secs Italiens	<i>S. capitis</i> , <i>S. carnosus</i> , <i>S. cohnii</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S. equorum</i> , <i>S. haemolyticus</i> , <i>S. kloosii</i> , <i>S. lentus</i> , <i>S. pasteurii</i> , <i>S. saprophyticus</i> , <i>S. sciuri</i> , <i>S. simulans</i> , <i>S. succinus</i> , <i>S. vitulinus</i> , <i>S. warneri</i> , <i>S. xylosus</i>	Rebecchi <i>et al.</i> , 1998; Cocolin <i>et al.</i> , 2001; Rossi <i>et al.</i> , 2001; Blaiotta <i>et al.</i> , 2004; Mauriello <i>et al.</i> , 2004; Rantsiou <i>et al.</i> , 2005b
Saucissons secs Français	<i>S. carnosus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S. saprophyticus</i> , <i>S. warneri</i> , <i>S. xylosus</i>	Montel <i>et al.</i> , 1992
Saucissons secs Argentins	<i>S. saprophyticus</i>	Fontana <i>et al.</i> , 2005
Saucissons secs Grecs	<i>S. auricularis</i> , <i>S. capitis</i> , <i>S. carnosus</i> , <i>S. cohnii</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S. haemolyticus</i> , <i>S. hominis</i> , <i>S. lentus</i> , <i>S. saprophyticus</i> , <i>S. sciuri</i> , <i>S. simulans</i> , <i>S. warneri</i> , <i>S. xylosus</i>	Papamanoli <i>et al.</i> , 2002 ; Drosinos <i>et al.</i> , 2004

Dans le cas des fromages fabriqués au lait pasteurisé, l'ajout de ferments tels que *S. equorum* et *S. succinus* est largement utilisé lors de l'affinage des fromages (Place *et al.*, 2002; Place *et al.*, 2003 a,b). Ainsi, des fromages tels que le Stilton, à pâte persillée, et des fromages à pâte pressée non cuite, comme les fromages irlandais de type « Ardrahan » et « Millens » sont uniquement colonisés en surface par l'espèce *S. equorum* (Ercolini *et al.*, 2003 ; Mounier *et al.*, 2005). Mais malgré l'utilisation de lait pasteurisé, il s'est avéré que des souches de *S. saprophyticus* ont été isolées de façon majoritaire en surface du fromage de type « Gubbeen » (Mounier *et al.*, 2005).

Enfin, du fait de la capacité de certains staphylocoques à résister à la dessiccation et à survivre dans l'environnement en attente de conditions favorables (Minor, 1976), Garcia *et al.*, en 1987, observèrent une forte colonisation des fromages affinés, par des staphylocoques résistants à la novobiocine, plus particulièrement *S. equorum*, *S. sciuri*, et *S. xylosus*, par rapport aux staphylocoques novobiocine-sensibles, qui se développent plus difficilement dans de telles conditions.

3-2. Les SCN dans les produits carnés

3-2.1. Les matières premières carnées

Les staphylocoques présents dans les matières premières constituent la flore naturelle des produits carnés fermentés (Tableau 7). Des analyses menées sur des échantillons de viande de bœuf récupérés en sortie d'abattoir révèlent une flore variée, dépendant en grande partie des conditions d'abattage et de manutention. En effet, Shale *et al.* (2005) identifièrent une flore composée des espèces *S. lentus*, *S. sciuri* et *S. xylosus* contaminant la viande lors de l'abattage, et une autre composée des espèces *S. auricularis*, *S. capitis* et *S. warneri* probablement véhiculées par le personnel. Dans le cas de la viande fraîche de porc, la flore staphylococcale isolée d'échantillons prélevés au niveau des abattoirs, s'est avérée essentiellement composée des espèces *S. epidermidis* et *S. succinus* (Olsson *et al.*, 2003). Enfin, au niveau d'échantillons de peau de poulet, ce sont les espèces *S. sciuri*, *S. epidermidis* et *S. saprophyticus* qui ont été identifiées (Kawano *et al.*, 1996).

3-2.2. Les produits carnés

L'analyse de la flore staphylococcale de saucisses fraîches nonensemencées conservées à 4°C a montré que la population était initialement composée des espèces

S. xylosus (48%), *S. equorum* (24%), *S. pasteurii* (13%), *S. warneri* (10%), *S. haemolyticus* (3%), *S. succinus* (3%) et *S. saprophyticus* (1%) (Rantsiou *et al.*, 2005b). L'analyse dynamique de la population staphylococcique durant le stockage de ces saucisses a révélé que les espèces *S. pasteurii* et *S. warneri* étaient majoritaires les premiers jours, puis qu'au bout de trois jours *S. xylosus* devenait l'espèce prépondérante, et après 10 jours à 4°C, *S. equorum* était la seule espèce présente (Cocolin *et al.*, 2004; Rantsiou *et al.*, 2005b).

Au niveau des salaisons, la mûlée est soitensemencée avec des ferments tels que *S. carnosus* et *S. xylosus*, soit elle est naturellement fermentée par la flore indigène qui peut provenir de la matière première, des conditions technologiques (abattage, fabrication du saucisson...) et/ou de l'environnement (Larrouture *et al.*, 2000). Dans le cas des saucissons naturellement fermentés, la flore staphylococcique indigène est à un niveau initial voisin de 10^3 - 10^4 UFC/g (Unité Formant Colonie) dans la mûlée. Cette population augmente dès le début de la phase d'étuvage (Talon *et al.*, 2004) et se stabilise lors de la phase de séchage, à un taux de 10^6 UFC/g (Nychas & Arkoudelos, 1990 ; Blaiotta *et al.*, 2004a ; Rantsiou *et al.*, 2005a).

Dans la mûlée, la population staphylococcique est composée de multiples espèces. Ainsi, dans les saucissons italiens, Rebecchi *et al.* (1998) isolèrent *S. sciuri* (30%), *S. xylosus* (25%), *S. saprophyticus* (20%), *S. epidermidis* (15%) et *S. capitis* (5%), contrairement à Cocolin *et al.* (2001) qui isolèrent majoritairement *S. xylosus* (60%), *S. carnosus* (20%) et *S. simulans* (13%). Blaiotta *et al.* (2004a) identifiaient les espèces *S. epidermidis*, *S. pasteurii*, *S. saprophyticus*, *S. succinus* et *S. vitulinus*. Rantsiou *et al.* (2005a) identifiaient *S. xylosus*, ainsi que les espèces *S. sciuri/S. vitulinus* et *S. equorum/S. succinus*, ces espèces n'ayant pu être différenciées les unes des autres par la technique de DGGE utilisée.

En fin de fabrication, il subsiste généralement un petit nombre d'espèces dans la flore des saucissons naturellement fermentés. Ainsi, Rebecchi *et al.* (1998) isolèrent *S. xylosus* (45%) et *S. sciuri* (55%), tandis que Rantsiou *et al.* (2005a) isolèrent *S. xylosus*, *S. equorum* et *S. succinus*. Dans d'autres saucissons italiens, c'est *S. xylosus* qui domine la flore staphylococcique (Cocolin *et al.*, 2001 ; Blaiotta *et al.*, 2004a). L'étude de la flore staphylococcique de trois salamis grecs a montré que *S. saprophyticus* était l'espèce majoritaire, représentant respectivement 72%, 22% et 45% des isolats (Samelis *et al.*, 1998 ; Papamanoli *et al.*, 2002 ; Drosinos *et al.*, 2005). Cette espèce a aussi été majoritairement isolée dans des saucissons secs argentins (Fontana *et al.*,

2005). Dans des saucisses de type « chorizo », la flore est dominée par *S. carnosus*, *S. epidermidis* et *S. xylosus* (Garcia-Varona *et al.*, 2000; Aymerich *et al.*, 2003). Dans les saucissons secs français, Montel *et al.* (1992) identifièrent majoritairement les espèces *S. xylosus* et *S. saprophyticus*.

Dans les salaisons de type jambon cru, *S. equorum*, *S. saprophyticus* et *S. xylosus* sont les principales espèces isolées (Rodriguez *et al.*, 1994; Cordero & Zumalacarregui, 2000; Vilar *et al.*, 2000). L'étude de Cordero *et al.* (2000) a montré que la saumure utilisée dans la fabrication des jambons ibériques était la principale source de la flore staphylococcale isolée en surface des jambons crus. Parmi les isolats appartenant au genre *Staphylococcus* (60% de la flore isolée), beaucoup d'espèces ont été identifiées: *S. xylosus* (29%), *S. equorum* (18%), *S. saprophyticus* (4%), *S. kloosii* (2%), *S. capitis* et *S. sciuri* (1,6%), *S. gallinarum* (1,4%), et *S. caprae*, *S. chromogenes*, *S. epidermidis*, *S. hominis*, *S. lentus*, *S. schleiferi* et *S. simulans* (<1%) (Cordero & Zumalacarregui, 2000). Une analyse plus complète de la flore staphylococcale présente en différents points de la fabrication des jambons crus a mis au jour la répartition des SCN. Vilar *et al.* (2000) ont identifié en surface de la viande crue les espèces *S. xylosus* (32%), *S. saprophyticus* et *S. capitis* (20%), *S. sciuri* (12%) et *S. equorum* (4%). Au niveau des jambons après salage, ce sont les espèces *S. saprophyticus* et *S. simulans* (24%), *S. xylosus* et *S. sciuri* (16%) et *S. equorum* (4%) qui ont été identifiées. Enfin, en surface des jambons en fin de sèche, la flore staphylococcale est représentée par les espèces *S. saprophyticus* (16%), *S. xylosus* et *S. sciuri* (16%) et *S. capitis* (8%). De plus, les auteurs ont identifié les SCN présents au cœur des échantillons. Les matières premières étaient contaminées par les espèces *S. saprophyticus* (24%), *S. sciuri* (20%), *S. xylosus* (12%), *S. capitis* (4%), la flore des jambons après salage par les espèces *S. simulans* (20%), *S. saprophyticus*, *S. xylosus* et *S. equorum* (8%), *S. warneri* (4%) et les jambons en fin de sèche par *S. saprophyticus* (24%), *S. capitis* (20%) et *S. equorum* (4%). Ainsi il apparaît qu'il existe une sélection des espèces au cours du procédé de fabrication des jambons qui est différente en surface et à cœur.

- CHAPITRE III -

ROLE DES SCN SUR LES QUALITES SENSORIELLES ET HYGIENIQUES DES ALIMENTS FERMENTES

1 - LES QUALITES SENSORIELLES DES ALIMENTS FERMENTES

Les staphylocoques à coagulase négative, qu'ils soient utilisés comme ferments dans les salaisons (*S. carnosus* et *S. xylosus*) et dans les fromages (*S. equorum*, *S. succinus*) ou présents naturellement dans le produit, participent activement à l'élaboration de la couleur et de la flaveur (Stahnke, 1995; Irlinger *et al.*, 1997; Talon *et al.*, 2002).

1-1. La couleur

1-1.1. Les salaisons

Dans l'industrie de la salaison, les nitrites ou indirectement les nitrates sont largement utilisés pour leurs propriétés conservatrices et leur participation au développement des qualités organoleptiques (Talon *et al.*, 2002). En effet, les SCN, essentiellement *S. carnosus* et *S. xylosus*, grâce à leur activité nitrate réductase jouent un rôle clé dans la formation de la couleur en réduisant ces nitrates en nitrites (Talon *et al.*, 1999). Les nitrites sont ensuite réduits en oxyde d'azote qui réagit avec les pigments de la viande (essentiellement de la myoglobine) pour former de la nitrosomyoglobine de couleur rouge. La production d'oxyde d'azote pourrait résulter de l'activité des nitrites réductases bactériennes. Mais il est plus probable que les nitrites soient réduits spontanément à pH acide (5.0-5.5). De plus, les SCN, du fait de leur activité catalase, contribuent à la stabilité de la couleur. En effet, ils détruisent le peroxyde d'hydrogène produit en aérobiose par certaines bactéries lactiques qui, en se combinant à la

nitrosomyoglobine, forme de la cholémyoglobine de couleur verte responsable de défauts de coloration dans le produit. (Barrière *et al.*, 2001a; Barrière *et al.*, 2001b).

1-1.2. Les fromages

Les fromages à croûte lavée ou morgée tels que le Munster, le Maroilles, le Reblochon, le Port-Salut, constituent un groupe particulier pour lequel le développement des micro-organismes de surface est recherché. En effet, au cours de l'affinage, des soins de croûte (lavages, frottages, salages) permettent la formation d'un enduit superficiel visqueux souvent de couleur orangée, riche en micro-organismes (Reps, 1993). Outre l'utilisation répandue des souches de *Brevibacterium linens* pour la coloration de la surface des fromages à croûte lavée, certaines souches de *S. xylosus* qui synthétisent naturellement des carotènes, responsables de la pigmentation orange des colonies (Kloos & Schleifer, 1986), sont aussi utilisées comme ferment pour l'affinage de ces types de fromages (producteurs de ferments, communication personnelle). Néanmoins, il existe peu d'informations sur le rôle des SCN dans la couleur des fromages.

1-2. La flaveur

La flaveur est une caractéristique organoleptique très recherchée dans les produits alimentaires fermentés et elle englobe les notions de goût, d'arôme et d'odeur. Sa perception dépend de la texture du produit. La flaveur résulte d'un équilibre entre la fraction volatile (les molécules odorantes: alcools, esters, aldéhydes, cétones, terpènes, composés soufrés, acides...) et la fraction non volatile (les molécules sapides: acides aminés, acides gras, acides) qui interagissent entre elles ainsi qu'avec les protéines et les lipides. Les molécules sapides et odorantes proviennent de la matière première, des ingrédients rajoutés et du catabolisme des glucides, des protéines et des lipides par des réactions chimiques et enzymatiques (Figures 1 et 2). Mais actuellement, dans le cas des salaisons, il est encore difficile de faire la part entre l'action des enzymes tissulaires et des enzymes microbiennes et de connaître l'origine de certains composés. Néanmoins, l'utilisation de ferments staphylococaux et surtout le choix des espèces semblent influencer la flaveur du produit fini (Sondergaard & Stahnke, 2002), du fait de la diversité de composés aromatiques produits par les SCN (Berdagué *et al.*, 1993 ; Montel *et al.*, 1996).

Le rôle des staphylocoques dans l'élaboration de la flaveur dans les fromages a été très peu décrit dans la littérature. A notre connaissance, seule l'étude de Place *et al.* (2003b) s'est penchée sur l'influence des espèces *S. equorum* et *S. xylosus* dans la formation de la flaveur.

Figure 1 : Formation des principaux composés volatils lors du catabolisme des acides aminés et des glucides dans les fromages et les salaisons.

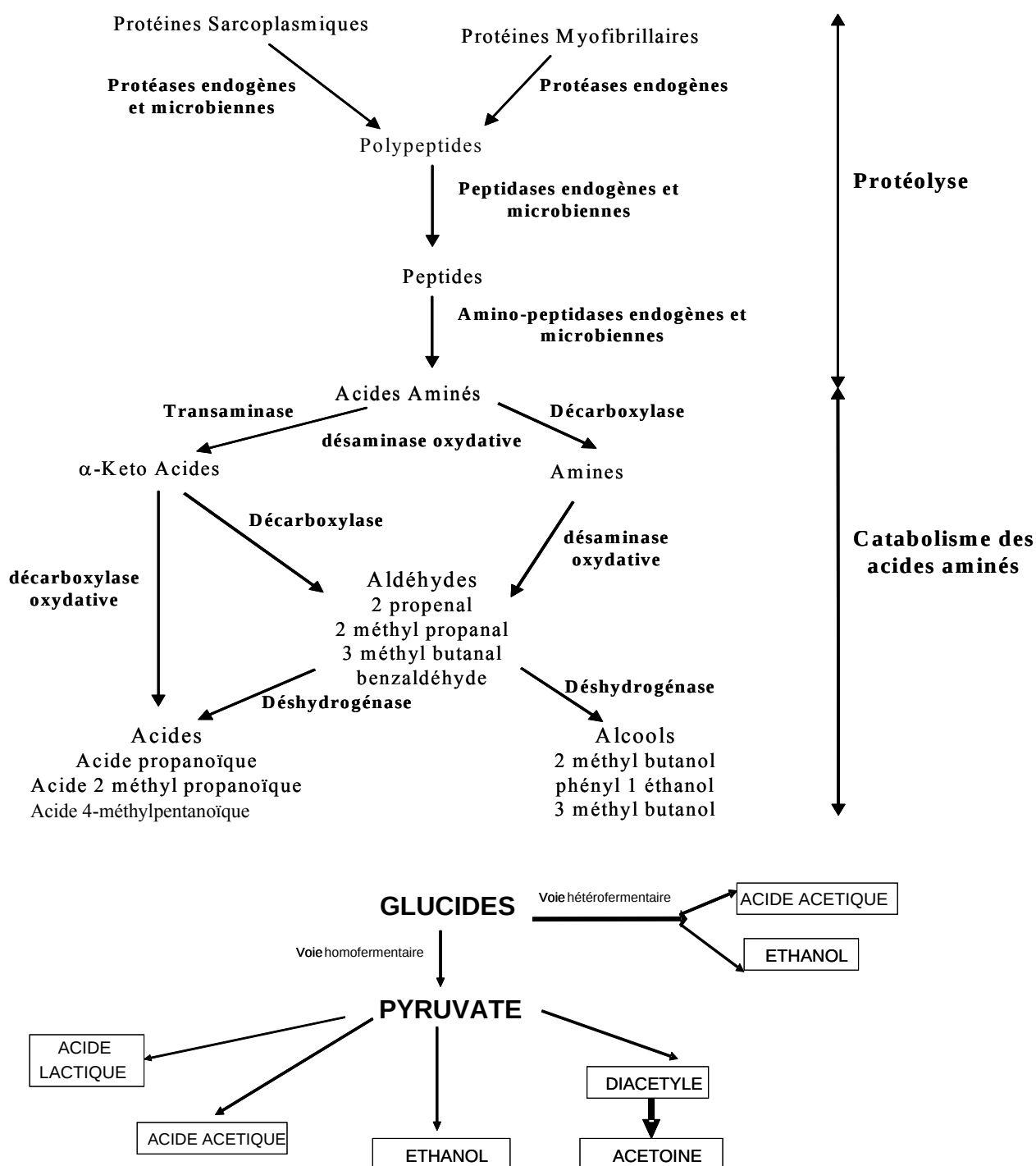
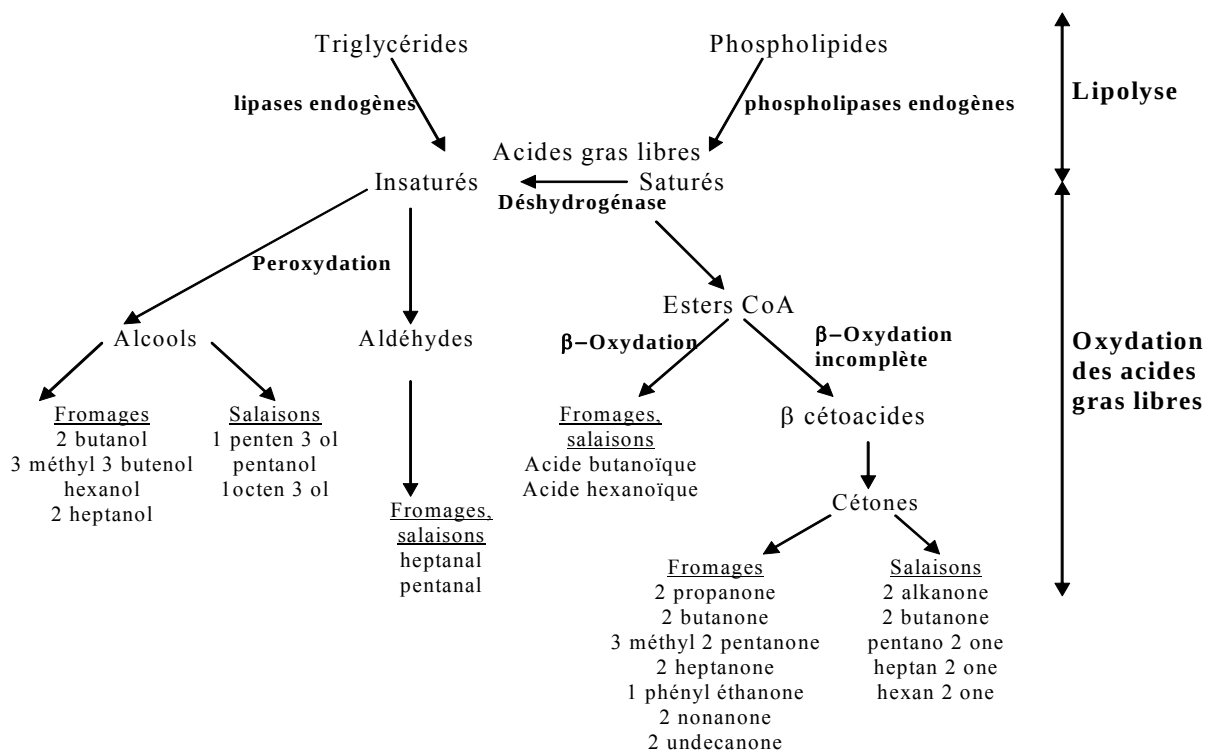


Tableau 8 : Principaux composés volatils des fromages et des salaisons formés sous l’action des SCN (Berdagué *et al.*, 1993 ; Montel *et al.*, 1996 ; Place *et al.*, 2003)

Molécules	Note aromatique	Métabolisme	Espèces impliquées	Origine
Aldéhydes				
2-propenal	Non déterminée	Acides aminés	<i>S. equorum</i> , <i>S. succinus</i>	Fromages
2-méthyl propanal	Malt, beurre	Acides aminés	<i>S. equorum</i> , <i>S. succinus</i>	Fromages, salaisons
3-méthyl butanal	Chocolat	Acides aminés	<i>S. carnosus</i> , <i>S. equorum</i> , <i>S. succinus</i>	Fromages, salaisons
Pentanal	Herbacée	Lipides	<i>S. carnosus</i> , <i>S. equorum</i> , <i>S. succinus</i>	Fromages, salaisons
Benzaldéhyde	Amande amère	Acides aminés	<i>S. equorum</i>	Fromages, salaisons
Heptanal	Gras	Lipides	<i>S. carnosus</i> , <i>S. equorum</i> , <i>S. succinus</i>	Salaisons
Acides				
Acide butanoïque	Rance	Lipides	<i>S. equorum</i> , <i>S. succinus</i>	Fromages, salaisons
Acide 2-méthyl butanoïque	Fromage fort, pieds	Acides aminés	<i>S. equorum</i> , <i>S. succinus</i>	Fromages, salaisons
Acide propanoïque	Fruitée	Acides aminés	<i>S. equorum</i> , <i>S. succinus</i>	Fromages
Acide 2-méthyl propanoïque	Acide, beurre rance	Acides aminés	<i>S. equorum</i> , <i>S. succinus</i>	Fromages, salaisons
Acide 4-méthyl pentanoïque	Fromage fort	Acides aminés	<i>S. equorum</i> , <i>S. succinus</i>	Fromages
Acide hexanoïque	Fromage bleu	Lipides	<i>S. equorum</i> , <i>S. succinus</i>	Fromages, salaisons
Acide acétique	Vinaigre	Glucides	<i>S. equorum</i> , <i>S. saprophyticus</i> , <i>S. succinus</i> , <i>S. warneri</i>	Fromages, salaisons
Acide lactique	Acide	Glucides	<i>S. carnosus</i> , <i>S. xylosus</i>	Salaisons
Alcools				
2-butanol	Non déterminée	Lipides	<i>S. equorum</i> , <i>S. succinus</i>	Fromages
3-méthyl-3-buten-1-ol	Épices	Lipides	<i>S. equorum</i> , <i>S. succinus</i>	Fromages
3-méthyl butanol	Fruitée	Acides aminés	<i>S. equorum</i> , <i>S. succinus</i> , <i>S. xylosus</i>	Fromages, salaisons
2-méthyl butanol	Non déterminée	Acides aminés	<i>S. equorum</i> , <i>S. succinus</i> , <i>S. xylosus</i>	Fromages, salaisons
Hexanol	Fruitée	Lipides	<i>S. equorum</i> , <i>S. succinus</i>	Fromages, salaisons
2-heptanol	Gras	Lipides	<i>S. equorum</i> , <i>S. succinus</i>	Fromages
Phényl-1-éthanol	Florale	Acides aminés	<i>S. equorum</i> , <i>S. succinus</i> , <i>S. xylosus</i>	Fromages, salaisons
1-penten-3-ol	Non déterminée	Lipides	<i>S. equorum</i> , <i>S. succinus</i> , <i>S. xylosus</i>	Salaisons
Pentanol	Fruitée	Lipides	<i>S. equorum</i> , <i>S. succinus</i> , <i>S. xylosus</i>	Salaisons
1-octen-3-ol	Champignon	Lipides	<i>S. equorum</i> , <i>S. succinus</i> , <i>S. xylosus</i>	Salaisons
Cétones				
3-hydroxybutan-2-one (acétoïne)	Beurre, produits laitiers	Glucides	<i>S. equorum</i> , <i>S. saprophyticus</i> , <i>S. warneri</i> , <i>S. xylosus</i>	Fromages, salaisons
2, 3-butanedione (diacétyl)	Produits laitiers	Glucides	<i>S. carnosus</i> , <i>S. equorum</i> , <i>S. succinus</i> , <i>S. saprophyticus</i> , <i>S. warneri</i> , <i>S. xylosus</i>	Fromages, salaisons
2-propanone	Fruitée	Lipides	<i>S. equorum</i> , <i>S. succinus</i>	Fromages
2-butanone	Fruitée	Lipides	<i>S. equorum</i> , <i>S. succinus</i> , <i>S. xylosus</i>	Fromages, salaisons
3-méthyl-2-pentanone	Fruitée	Lipides	<i>S. equorum</i> , <i>S. succinus</i>	Fromages, salaisons
1-phényl éthanone	Verte	Lipides	<i>S. equorum</i> , <i>S. succinus</i>	Fromages
2-nonanone	Fruitée	Lipides	<i>S. equorum</i> , <i>S. succinus</i>	Fromages, salaisons
2-undecanone	Florale	Lipides	<i>S. equorum</i> , <i>S. succinus</i>	Fromages
Méthyl cétones				
2-alkanone	Salami	Lipides	<i>S. xylosus</i>	Salaisons
Pentan-2-one	Saucisson sec	Lipides	<i>S. carnosus</i> , <i>S. xylosus</i>	Salaisons
Heptan-2-one	Saucisson sec	Lipides	<i>S. carnosus</i> , <i>S. xylosus</i>	Salaisons
Hexan-2-one	Saucisson sec	Lipides	<i>S. carnosus</i> , <i>S. xylosus</i>	Salaisons
Composés soufrés				
Diméthyl disulfide	Légumes	Non déterminée	SCN	Fromages, salaisons
Terpènes				
Limonène	Citronnée	Non déterminée	SCN	Fromages, salaisons
Triméthyl benzène	Herbacée	Non déterminée	SCN	Fromages, salaisons



1-2.1. Le métabolisme des glucides

1-2.1.1. Les salaisons

La fermentation des glucides essentiellement ajoutés à la mûlée sous forme de glucose ou de saccharose, conduit principalement à la formation d'acide lactique qui confère un goût acide au saucisson (Tableau 8). Cette fermentation est assurée par les bactéries lactiques. Néanmoins, Montel *et al.* (1993), et Arkoudelos et Nychas (1995) ont rapporté que les SCN, notamment les espèces *S. carnosus* et *S. warneri*, ont un rôle mineur dans la formation du lactate.

En condition anaérobie, les espèces *S. carnosus*, *S. saprophyticus* et *S. warneri* catabolisent le glucose et les pentoses en acides lactique et acétique, et en éthanol par hétérofermentation (Figure 1) (Arkoudelos & Nychas, 1995). L'acide acétique joue un rôle important dans l'arôme de salaison en apportant une note de vinaigre, mais en excès, entraîne un goût piquant. L'éthanol ne participe pas directement à la flaveur mais entraînerait des réactions secondaires conduisant à des éthyl esters apportant une note

fruitée (Montel *et al.*, 1996). *S. warneri* possède une activité estérasique forte qui pourrait être à l'origine des esters formés dans le saucisson (Montel *et al.*, 1996 ; Talon *et al.*, 1998). L'arôme de beurre ou de produit laitier de certaines salaisons est associé à la présence d'acétoïne et/ou de diacétyl qui pourrait provenir du métabolisme du pyruvate par les SCN (Berdagué *et al.*, 1993). Montel *et al.* (1996) ont montré la corrélation entre une forte production de diacétyl et d'acétoïne *in vitro* par des souches de *S. saprophyticus* et de *S. warneri* et les fortes concentrations de ces composés dans des saucissons inoculés par ces souches. En revanche, l'inoculation de *S. carnosus* et *S. xylosus* conduit à une concentration plus faible de ces composés.

1-2.1.2. Les fromages

Le lactose est hydrolysé par les bactéries lactiques en glucose et galactose. Le glucose est ensuite oxydé en pyruvate lors de la glycolyse. Le galactose est converti en glucose-6-phosphate et en glycéraldéhyde-3-phosphate. Le pyruvate est un précurseur de composés à courtes chaînes tels que le diacétyl, l'acétate, l'acétaldéhyde et l'éthanol. Le diacétyl est ensuite réduit successivement en 2,3-butanediol, 2-butanone et 2-butanol. Place *et al.* (2003b) ont montré que les espèces *S. equorum* et *S. succinus* étaient capables de produire de l'acide acétique, du diacétyl et de l'acétoïne à partir des glucides, en surface et au coeur du fromage de type Raclette.

1-2.2. Le métabolisme des protéines

Dans les salaisons, la matière première est composée d'environ 70% de tissu musculaire, constitué essentiellement par les protéines myofibrillaires, sarcoplasmiques et du tissu conjonctif, et c'est la principale source de composés azotés. Dans les produits laitiers, les protéines du lait sont composées des caséines qui représentent 75 à 80% des protéines totales et des protéines du lactosérum.

Le catabolisme des protéines est constitué de deux principales étapes : la protéolyse, qui comprend la dégradation des protéines en peptides puis en acides aminés, et le catabolisme des acides aminés (Figure 1). L'implication des SCN dans ces deux étapes a été étudiée dans les salaisons, tandis que seuls les composés aromatiques provenant de la dégradation des acides aminés par les SCN ont été analysés dans le cas des fromages.

1-2.2.1. La protéolyse

1-2.2.1.1. Les salaisons

Au cours de la maturation du saucisson, la fraction protéique est diminuée de moitié après 40 jours de maturation sous l'effet de l'hydrolyse des protéines en polypeptides, peptides et acides aminés (Talon *et al.*, 2002). La protéolyse est due essentiellement aux enzymes tissulaires endogènes, elle se traduit par une augmentation des teneurs en azote total non protéique et en acides aminés libres. Cependant, les souches de *S. xylosus* isolées de produits carnés crus fermentés ont une faible activité protéolytique sur les protéines myofibrillaires, tandis que certaines souches sont impliquées dans l'hydrolyse des protéines sarcoplasmiques durant la maturation du saucisson (Miralles *et al.*, 1996). Par contre, la dégradation des peptides en acides aminés est due en partie aux micro-organismes (40%) et le reste est attribué aux enzymes endogènes. Ceci a été démontré par l'étude de saucissons contenant des antibiotiques qui ont des concentrations plus faibles en acides aminés que ceux inoculés avec des staphylocoques (Molly *et al.*, 1997). Néanmoins, l'activité peptidasique des SCN est plus faible que celle des bactéries lactiques (Montel *et al.*, 1996).

1-2.2.1.2. Les fromages

Les caséines sont hydrolysées par les enzymes, telles que la chymosine, provenant de la présure utilisée pour faire cailler le lait, et la plasmine, la principale protéase présente naturellement dans le lait. Les enzymes de la flore microbienne des fromages catabolisent ensuite les produits de l'hydrolyse des caséines en petits peptides et en acides aminés libres (Fox & McSweeney, 1996). Il est admis qu'il n'y a pas systématiquement de corrélation directe entre la formation de la flaveur et la concentration en acides aminés libres dans les fromages (Engels *et al.*, 1994). Certaines enzymes bactériennes, telles que les aminotransférases, sont impliquées dans la première étape du catabolisme des acides aminés, comme cela a été montré chez *S. equorum*. En particulier, Curtin *et al.* (2002) ont montré *in vitro* que la souche *S. equorum* 14 possède une activité L-méthionine aminotransférase impliquée dans la dégradation de la L-méthionine en composés volatils, responsables de l'arôme aillé des fromages affinés. En outre, il semble que les souches 6 et 14 de *S. equorum* sont capables de cataboliser *in vitro* la cystathionine grâce à leur activité cystathionine lyase qui pourrait intervenir dans le développement de la flaveur dans les fromages.

1-2.2.2. Le catabolisme des acides aminés

Les acides aminés peuvent être dégradés en amines, en ammoniacque ou en divers composés tels que les aldéhydes, les acides et les alcools qui ont des propriétés olfactives (Figure 1, Tableau 8).

1-2.2.2.1. Les salaisons

Le rôle des enzymes tissulaires et microbiennes dans le catabolisme des acides aminés n'est pas encore bien établi. Ce catabolisme pourrait faire intervenir la réaction de Strecker qui comprend une désamination oxydative suivie d'une décarboxylation des acides aminés à haute température. Malgré l'utilisation de basses températures lors de la fabrication du jambon cru et du saucisson, cette réaction pourrait se produire en raison de la forte teneur en acides aminés et des faibles valeurs d'activité de l'eau (Barbieri *et al.*, 1992 ; Hinrichsen *et al.*, 1994 ; Talon *et al.*, 2002). Néanmoins, la production de ces molécules dans le saucisson est modulée par la floreensemencée et en particulier par les staphylocoques (Berdagué *et al.*, 1993; Montel *et al.*, 1996). En effet, dans les saucissons inoculés par *S. carnosus*, les concentrations en 3-méthyl butanol, du 3-méthyl butanal et de l'acide 3-méthyl butanoïque sont plus importantes que dans ceux inoculés par *S. warneri* et *S. saprophyticus*. Le 3-méthyl butanal joue un rôle important dans l'arôme de salaison dans des saucissons inoculés avec *S. xylosus* (Stahnke, 1995). Hinrichsen *et al.* (1994) associent la détection de 3-méthyl butanal à la présence de *S. warneri*, *S. saprophyticus* et *S. xylosus* dans le bacon. *In vitro*, *S. carnosus* produit à partir de la leucine d'importantes quantités d'acide 3-méthyl butanoïque mais aussi du 3-méthyl butanal et du 3-méthyl butanol (Masson *et al.*, 1999 ; Larrouture *et al.*, 2000).

1-2.2.2.2. Les fromages

La dégradation des acides aminés conduit dans les fromages de type Raclette à la formation d'aldéhydes, d'acides et d'alcools (Place *et al.*, 2003b). Ainsi, sous l'action des espèces *S. equorum* et *S. succinus*, des notes de beurre et de chocolat sont apportées par le 2-méthyl propanal et le 3-méthyl butanal. *S. equorum* semble capable de synthétiser aussi du benzaldéhyde, responsable d'une note d'amande amère dans le fromage. Enfin, à partir des aldéhydes ces deux espèces peuvent produire des acides, tels que les acides propanoïque, 2-méthyl propanoïque, 4-méthyl pentanoïque et 2-méthyl butanoïque responsables des notes fruitée, de beurre rance et de fromage fort du produit. En outre, la dégradation des aldéhydes est aussi responsable de la formation des

alcools 2 et 3-méthyl butanol et du phényl éthanol, qui donnent des notes fruitée et florale au fromage de type Raclette (Place *et al.*, 2003b).

1-2.3. Le métabolisme des lipides

Dans le cas des salaisons, les lipides du saucisson proviennent principalement du tissu adipeux (1/3 de la matière première) et dans une faible proportion du tissu musculaire. Les lipides du tissu adipeux sont surtout représentés par des triglycérides. Les lipides du tissu musculaire sont majoritairement des triglycérides (62 à 80%) et des phospholipides (16 à 34%). Les triglycérides et les phospholipides sont dégradés dans les fromages et les saucissons via des réactions de lipolyse et d'oxydation.

1-2.3.1. La lipolyse

1-2.3.1.1. Les salaisons

La lipolyse se traduit par une augmentation des concentrations en acides gras libres et diglycérides dès l'étuvage et tout au long de la maturation (Demeyer *et al.*, 1974). Les lipides sont majoritairement hydrolysés par les lipases tissulaires (Molly *et al.*, 1996). Les micro-organismes lipolytiques tels que les staphylocoques pourraient participer à cette dégradation. Des gènes codant des lipases ont été identifiés chez *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. warneri* et *S. xylosus* (Götz *et al.*, 1998 ; Longshaw *et al.*, 2000 ; Rosenstein & Götz, 2000 ; Mosbah *et al.*, 2005). Cependant, les activités lipolytiques de *S. xylosus* et *S. saprophyticus* sont respectivement optimales à pH 8,2, 45°C et pH 7, 30°C, conditions qui sont incompatibles avec celles trouvées lors de la fabrication du saucisson (soit pH 5, 20°C) et en présence de 3,5% de sel (Talon *et al.*, 1993; Kenneally *et al.*, 1998). De même, l'activité lipolytique de *S. warneri* maximale à pH 9 est inhibée à pH 5,5 (Talon *et al.*, 1995).

En outre, l'ensemencement de staphylocoques lipolytiques dans des saucissons n'engendre pas d'augmentation significative de la teneur en acides gras libres (Montel *et al.*, 1993). L'ensemble de ces études montre que seule 20 à 30% de la dégradation totale des lipides serait due à l'action des micro-organismes (Hierro *et al.*, 1997). De plus, l'impact des acides gras libérés sur la saveur n'a pas été jusqu'à ce jour démontré dans le cas des salaisons. Les acides gras seraient en fait essentiellement des précurseurs de molécules aromatiques (Talon *et al.*, 2002).

1-2.3.1.2. Les fromages

C'est durant l'affinage des fromages que la plupart des triglycérides sont hydrolysés (Molimard & Spinnler, 1996). Néanmoins, les lipases bactériennes, dont les lipases staphylococcales, semblent moins impliquées dans le métabolisme des lipides que les moisissures. De plus, il existe peu de données dans la littérature concernant l'implication des SCN dans la lipolyse des triglycérides des fromages.

1-2.3.2. L'oxydation des acides gras

Cette oxydation peut être chimique (peroxydation) ou enzymatique (β -oxydation). La peroxydation est un processus radicalaire qui génère en bout de processus des produits d'oxydation secondaires comme par exemple des aldéhydes et des alcools. Certains produits sont très volatils et ont un seuil de perception très faible, de l'ordre de quelques ppm. Par conséquent, ils jouent un rôle déterminant dans le développement de la flaveur du produit final.

1-2.3.2.1. Les salaisons

Dans le saucisson, les micro-organismes sont fortement impliqués dans la régulation des phénomènes oxydatifs. Ainsi, des saucissons modèlesensemencés avec *S. carnosus* et *S. xylosus* présentent de plus faibles concentrations en alcanes et en aldéhydes que ceux ensemencés avec *S. warneri* et *S. saprophyticus* (Berdagué *et al.*, 1993; Montel *et al.*, 1996). Ces derniers sont caractérisés par un arôme de rance (Montel *et al.*, 1996). *In vitro*, *S. saprophyticus*, *S. warneri* mais surtout *S. xylosus* et *S. carnosus* limitent l'oxydation des acides gras insaturés linoléique et linolénique (Talon *et al.*, 2000). Les activités catalase et superoxyde dismutase (SOD) de *S. carnosus* ont été caractérisées (Barrière *et al.*, 2001b). Chez *S. xylosus*, Barrière *et al.*, (2001a; 2001b) ont montré à l'aide de mutants déficients pour l'activité SOD ou catalase que ces enzymes contribuent à limiter l'oxydation des acides gras insaturés.

La présence de méthyl cétones dans les saucissons est associée à l'inoculation de *S. xylosus* ou *S. carnosus* (Berdagué *et al.*, 1993; Montel *et al.*, 1996). Ces méthyl cétones peuvent provenir d'une β -oxydation incomplète des acides gras. Normalement la β -oxydation dégrade les acides gras saturés en acide acétique par éliminations successives de groupements acétyl CoA. Cependant, des intermédiaires esters-CoA peuvent être libérés ; ils sont successivement convertis en β -cétoacides par une activité thioestérase puis en méthyl cétone et en alcool secondaire sous l'action d'une

décarboxylase et d'une déshydrogénase. Engelvin *et al.* (2000) ont montré que des intermédiaires étaient libérés au cours du cycle de β -oxydation chez *S. carnosus*. Ils ont également mis en évidence une activité thioestérase chez cette souche. Fadda *et al.* (2002) ont mis en évidence chez *S. carnosus* une activité décarboxylase constitutive qui est impliquée dans la production de méthyl cétones.

1-2.3.2.2. Les fromages

Dans le cas des fromages, le catabolisme des acides gras est le principal générateur de composés aromatiques et de précurseurs de molécules odorantes telles que les cétones, les alcools et les esters (Figure 2 et Tableau 8). Place *et al.* (2003b) ont ainsi analysé divers composés aromatiques formés lors de la dégradation des acides gras par *S. equorum* et *S. succinus*. Des aldéhydes, des acides, des alcools et des cétones sont formés lors de la dégradation des acides gras: par exemple, le pentanal apporte une note herbacée au fromage, tandis que dans le cas des acides, les acides butanoïque, 2-méthyl butanoïque et hexanoïque apportent des notes de rance, de fromage fort et de fromage bleu. Enfin, des alcools tels que le 3-méthyl-3-butenol, l'hexanol et le 2-heptanol donnent une flaveur marquée par des notes d'épices, de gras et fruitées, tandis que les cétones telles que le 2-propanone, le 2-butanone, le 3-méthyl-2-pentanone, le phényl éthanone, le 2-nonanone et le 2-undécanone apportent des notes fruitée, verte et florale au fromage.

2 - ROLES SUR LES QUALITES HYGIENIQUES DES ALIMENTS

2-1. Risques liés à la production de toxines

Staphylococcus aureus a la propriété de produire des entérotoxines. Ainsi, il est le deuxième agent en France responsable de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC), du fait de l'ingestion d'entérotoxines présentes dans les aliments (intoxication). Les sources alimentaires contaminées par ces entérotoxines sont le plus souvent le lait ou les produits lactés et les plats préparés. Bien que majoritairement décrite chez les souches de *S. aureus* à coagulase positive, la production d'entérotoxines est également décrite chez certains staphylocoques à coagulase négative.

Les entérotoxines staphylococcales (SE) décrites chez *S. aureus* sont des toxines émétiques, pyrogènes et ayant la propriété de super antigène (Balaban & Rasooly, 2000;

Dinges *et al.*, 2000). Neuf types antigéniques majeurs de SE ont été décrits: SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEG, SEH, SEI et SEJ. Seules cinq de ces toxines (SEA à SEE) ont été impliquées dans des TIAC. Récemment, des gènes codant des entérotoxines homologues aux neuf antigènes majeurs ont été identifiées : seK, seL, seM, seN, seO, seP, seQ, seR et seU (Rosec & Gigaud, 2002 ; Blaiotta *et al.*, 2004b).

La production de SE par les SCN a fait l'objet de plusieurs études. La présence des gènes codant les entérotoxines SEC et/ou SED a été montrée chez des souches de *S. cohnii*, *S. epidermidis* et *S. xylosus* isolées du jambon cru (Marin *et al.*, 1992; Rodriguez *et al.*, 1996). Cependant, il s'avère que les souches de SCN isolées des produits carnés sont rarement porteuses de gènes codant les SE (Rosec *et al.*, 1997; Blaiotta *et al.*, 2004b).

Dans le cas des produits laitiers, le pis des animaux de ferme constituerait un réservoir privilégié des souches de SCN entérotoxiques, d'autant plus lorsque ceux-ci sont atteints de mammites (Bautista *et al.*, 1988). Dans le lait et le fromage de chèvre, Vernozy-Rozand *et al.* (1996) ont isolé des souches de *S. equorum*, *S. capitis*, *S. lentus*, *S. simulans* et *S. xylosus* productrices de SEE. Valle *et al.* (1990) ont montré que 22% des souches de SCN isolées au niveau de la peau des pis, des muqueuses nasales et du lait de chèvres saines étaient capables de synthétiser l'entérotoxine C (SEC). Dans le lait de brebis, la production de différentes entérotoxines a été détectée chez des souches de *S. cohnii* et *S. epidermidis* (SEC), *S. xylosus* (SED) et *S. haemolyticus* (SEC, SED) (Bautista *et al.*, 1988). Diverses études s'accordent pour établir un lien entre sérotype entérotoxique et niche écologique des souches productrices de SE. Ainsi, l'entérotoxine C semble inféodée aux souches staphylococcales d'origine animale, tandis que les entérotoxines A et D seraient préférentiellement produites par des souches d'origine humaine (Hajek, 1978; Bautista *et al.*, 1988).

Cependant, à ce jour la présence de gènes codant des SE chez des souches de SCN reste très rare, d'autant plus lorsque celles-ci sont isolées de produits alimentaires (Rosec *et al.*, 1997 ; Blaiotta *et al.*, 2004b). C'est sans doute la raison pour laquelle aucune souche de SCN productrice de SE n'a été décrite jusqu'à présent comme impliquée dans des toxi-infections alimentaires.

2-2. Risques liés à la production d'amines biogènes

Les amines biogènes sont formées et dégradées pendant le métabolisme normal des animaux, des végétaux et des micro-organismes. On peut les retrouver dans de nombreux aliments, dans lesquels elles sont majoritairement produites par la décarboxylation des acides aminés (Suzzi & Gardini, 2003). L'accumulation des amines biogènes dans les aliments requiert la présence d'acides aminés libres, de micro-organismes possédant des activités aminoacides décarboxylases ainsi que des conditions favorables à la croissance de ces derniers.

En général, l'histamine, la putrescine, la cadavérine, la tyramine, la tryptamine, la 2-phényléthylamine, la spermine et la spermidine sont les amines biogènes les plus abondantes dans les aliments, notamment les aliments fermentés tels que les fromages et les saucissons secs. Dans les fromages, la 2-phényléthylamine peut être retrouvée en quantités importantes (Suzzi & Gardini, 2003). Dans les saucissons secs, la tyramine, la cadavérine et la putrescine sont les plus fréquemment détectées (Bover-Cid *et al.*, 2006). Les amines biogènes sont indésirables car elles sont toxiques, cette toxicité dépendant de la nature de l'amine, de la dose ingérée et de l'état physiologique de la personne. A moins de 50 mg, l'ingestion d'histamine peut provoquer des urticaires et à partir de 100 mg, des maux de tête et des troubles cardiaques (Askar & Treptow, 1986). Les symptômes liés à l'ingestion de tryptamine, de tyramine et de 2-phényléthylamine se limitent souvent à des maux de tête, tandis que la cadavérine et la putrescine ne provoquent pas de troubles mais peuvent se complexer avec des nitrites pour former des nitrosamines cancérigènes (Warthesen, *et al.* 1975).

Concernant la capacité des SCN à produire des amines biogènes, peu d'informations existent. L'étude de Martuscelli *et al.* (2000) suggère que parmi la population naturelle de *S. xylosus* isolée de saucissons italiens fermentés, certaines souches possèdent la capacité à produire des amines biogènes. Ils montrèrent que certaines souches de *S. xylosus* dotées d'une activité amino-acide décarboxylase pouvaient contribuer à la formation de tryptamine, de tyramine, de spermine et de spermidine, en particulier lors des premières étapes de la fermentation des saucissons quand les conditions chimico-physiques sont favorables à la croissance des staphylocoques. Mais aucune des souches de *S. xylosus* testées n'a produit d'histamine, de putrescine, de cadavérine et de 2-phényléthylamine. En revanche, la production d'histamine a été observée chez 76% des souches de *S. xylosus* isolées de saucissons espagnols (Hortensia Silla Santos, 1998 ; Suzzi & Gardini, 2003). Montel *et al.* (1999)

ont montré que certaines souches de *S. carnosus* et *S. piscifermentans* isolées de saucissons secs français sont capables de produire de la 2-phényléthylamine, de l'histamine, de la putrescine et de la cadavérine *in vitro* (Montel *et al.*, 1999). Néanmoins, certains auteurs associent la présence d'histamine avec l'utilisation de viande trop maturée et/ou des conditions d'hygiène impropres et la présence de micro-organismes dotés d'une activité histidine décarboxylase (Bover-Cid *et al.*, 2006).

L'activité protéolytique microbienne peut être responsable de la formation d'amines biogènes via l'accumulation de précurseurs (Paulsen & Bauer, 1997). Néanmoins, aucune corrélation n'a été démontrée entre l'activité protéolytique de *S. xylosus* utilisé en tant que ferment et la formation d'amines biogènes (Bover-Cid *et al.*, 1999).

Le taux d'amines biogènes dans les saucissons peut être diminué en limitant la contamination bactérienne des matières premières et par l'ensemencement de ferments, dont certains peuvent dégrader les amines biogènes. Par exemple, l'utilisation de souches de *S. carnosus* et de *S. xylosus* diminuent l'accumulation d'amines biogènes lors de la fabrication des saucisses espagnoles de type « fuets » et réduisent la proportion de celles-ci de 80 à 90% par rapport aux mêmes saucisses fabriquées sans ferment (Bover-Cid *et al.*, 2000). A contrario, Parente *et al.* (2001) ne trouvèrent aucune différence entre les quantités d'amines biogènes accumulées dans des saucissons fermentés naturellement et ceux fabriqués industriellement. Dans des saucisses turques de type « Soudjoucks », l'ajout de souches de *S. carnosus* et de *S. xylosus* a limité la formation de putrescine, mais pas de tyramine (Ayhan *et al.*, 1999). Les amines biogènes peuvent être dégradées par des amines oxydases bactériennes en aldéhydes, peroxyde d'hydrogène et ammoniac (Suzzi & Gardini, 2003). Ainsi, Martuscelli *et al.* (2000) montrèrent que certaines souches de *S. xylosus* isolées de saucissons artisanaux possédaient une activité amine oxydase et donc étaient capables de dégrader l'histamine et/ou la tyramine *in vitro*. De plus, une réduction importante du taux de tyramine et de putrescine a été observée en présence de souches de *S. xylosus* possédant une amine oxydase (Gardini *et al.*, 2003).

La présence d'amines biogènes dans les aliments fermentés est liée à la qualité des matières premières utilisées et aux activités enzymatiques de la population microbienne présente tout au long du procédé de fabrication. C'est pourquoi l'utilisation de ferments incapables de produire des amines biogènes, compétitifs vis-à-vis des micro-organismes producteurs d'amines biogènes et/ou capables de dégrader ces amines, associée à des

matières premières de qualité ainsi qu'à de bonnes pratiques de fabrication serait un moyen d'obtenir des produits sains.

2-3. Risques liés à la résistance aux antibiotiques

Les staphylocoques à coagulase négative, du fait de leur importante dissémination dans des environnements humain et animalier, sont couramment exposés aux pressions de sélection induites par l'usage des antibiotiques. L'usage extensif d'agents antimicrobiens conduit à la sélection de bactéries résistantes. Des études ont montré qu'au sein de certaines espèces de SCN des gènes de résistance aux antibiotiques étaient portés par des plasmides (Schwartz & Noble, 1994; Hauschild *et al.*, 2003). Ainsi ceux-ci deviennent des réservoirs de gènes de résistance qui peuvent être transférés entre espèces, et générer alors des souches multi-résistantes (Neu, 1992).

La littérature scientifique, très complète sur les souches cliniques, fait aussi état de la résistance aux antibiotiques des SCN isolés des environnements alimentaires. Ainsi, Gentilini *et al.* (2002) ont analysé la résistance à divers antibiotiques de SCN isolés sur des bovins laitiers atteints de mammites. Ils ont observé que sur 123 isolats de nombreux SCN étaient multi-résistants, c'est-à-dire résistants à deux voir cinq antibiotiques à la fois. De plus, ces résistances touchaient plusieurs classes d'antibiotiques, comme les β -lactamines (pénicilline, oxacilline), les macrolides (érythromycine) et les lincosamides (pirlimycine). Mauriello *et al.* (2000) ont isolé du salami italien de type Naples des souches de *S. xylosus* résistantes aux β -lactamines (amoxicilline) pour 80% des souches, aux macrolides (érythromycine) pour 50% des souches, aux lincosamides (lincomycine) pour 95% des souches, à la novobiocine et à l'acide fusidique pour 75% des isolats (Mauriello *et al.*, 2000). Enfin, Gardini *et al.* (2003) ont isolé des souches de *S. xylosus* et *S. saprophyticus* de trois saucissons italiens différents, résistantes elles aussi à plusieurs classes d'antibiotiques telles que les sulfonamides, les quinolones, les polymyxines (colistine) et les tétracyclines.

Dans le cas de produits alimentaires transformés à base de volaille et de boeuf, de nombreuses souches de *S. epidermidis* et *S. saprophyticus* ont été isolées et présentaient des résistances à l'ampicilline et à la pénicilline G, souvent associées à une résistance aux ammoniums quaternaires (Heir *et al.*, 1999).

Le risque lié à la dissémination des SCN antibio-résistants dans des environnements alimentaires tels que l'industrie de la salaison doit être pris en compte.

CONCLUSION BIBLIOGRAPHIQUE

En conclusion à cette étude bibliographique, il apparaît que certaines espèces de SCN sont d'un grand intérêt pour l'industrie alimentaire, notamment celle de la salaison. Elles sont utilisées comme ferments ou naturellement présentes dans les produits et participent aux qualités hygiéniques et sensorielles des produits carnés fermentés. Ces espèces contribuent à la formation de la couleur et à sa stabilité, ainsi qu'au développement de la flaveur via le catabolisme des glucides, des acides aminés et via la formation d'esters. Néanmoins, il faut également considérer le risque que peuvent représenter les SCN en raison de leur capacité à produire des amines biogènes ou des entérotoxines et des résistances aux antibiotiques qu'ils peuvent porter.

Mais la première étape pour caractériser les SCN est de pouvoir les identifier au niveau de l'espèce. Pour cela, il est nécessaire de développer des outils performants. C'est sur ce postulat que ce travail de thèse a reposé : développer des outils pertinents permettant l'identification fiable d'un écosystème staphylococcique lié à des salaisons traditionnelles.

RESULTATS

PARTIE 1

**Développement d'outils moléculaires pour l'identification
des bactéries appartenant au genre *Staphylococcus* et
aux espèces *S. xylosus*, *S. saprophyticus*, *S. epidermidis*
et *S. aureus*
(ARTICLES 1 et 2)**

1 - PROBLEMATIQUE

Les staphylocoques sont des bactéries ubiquitaires et ils font partie autant de la flore cutanéomuqueuse des animaux que de la flore des aliments fermentés. Les staphylocoques, et notamment les staphylocoques à coagulase négative (SCN), sont isolés de divers produits alimentaires, majoritairement des produits laitiers et carnés. Ainsi, les espèces *S. xylosus* et *S. saprophyticus* sont fréquemment isolées des aliments fermentés, notamment des salaisons traditionnelles. Les espèces *S. epidermidis* et *S. aureus* sont aussi isolées de produits carnés. Néanmoins, ces trois dernières espèces ne sont pas désirées dans les produits car ce sont des espèces pathogènes opportunistes. Le genre *Staphylococcus* comprend des espèces d'intérêt technologique et des espèces pathogènes opportunistes. Il est donc primordial d'identifier de façon fiable ces bactéries au niveau du genre et de l'espèce. De nombreux auteurs ont souligné le manque de fiabilité des méthodes phénotypiques pour l'identification des SCN. C'est pourquoi nous avons développé, au cours de ce travail, des outils moléculaires pour leur identification.

Au début de cette thèse, aucun outil moléculaire fiable n'était disponible pour l'identification de l'espèce *S. xylosus*, décrite dans la littérature comme dominant la flore des saucissons naturellement fermentés. C'est dans ce contexte que nous avons dans un premier temps développé des amorces spécifiques à cette espèce permettant son identification par PCR (article 1). Dans un deuxième temps, nous avons élaboré une stratégie d'identification des espèces pathogènes opportunistes isolées des salaisons traditionnelles grâce une PCR multiplex, réunissant dans une même réaction des couples d'amorces spécifiques au genre *Staphylococcus*, et aux espèces *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus* et *S. xylosus* (article 2).

2 - RESULTATS

Développement d'amorces spécifiques pour l'identification de l'espèce *S. xylosus* (article 1)

Une collection de 12 souches de référence de *S. xylosus* et de 27 souches isolées de produits laitiers, de saucissons et de l'environnement d'un atelier de salaison et identifiées à cette espèce, grâce à des observations microscopiques et des tests

phénotypiques sur la base des galeries miniaturisées « API-Staph », a été analysée par électrophorèse en champs pulsé (PFGE) après macro restriction de l'ADN avec les enzymes *SmaI* et *ApaI* et par l'étude du polymorphisme de fragments d'ADN amplifiés par PCR (RAPD) avec l'amorce 5, choisie parmi les 10 amorces testées (Wieser & Busse, 2000). Nous avons obtenu les résultats suivants :

- L'analyse par PFGE a révélé une grande diversité au sein de l'espèce *S. xylosus* puisque sept profils différents ont été observés parmi les 12 souches de référence (profils A à A5 et Ib). Parmi les 27 souches sauvages, seul sept souches ont montré des profils identiques ou proches à ceux observés pour les souches de *S. xylosus* de référence. Trois profils différents étaient observés au sein de ces sept souches (profils A5 à A7). Les 20 souches restantes ont généré des profils (profils B à M) sans relation avec ceux obtenus pour les souches de *S. xylosus*.
- L'analyse par RAPD a montré une forte homologie de profils entre les 12 souches de *S. xylosus* de référence et les 7 souches sauvages présentant des profils PFGE identiques ou proches aux souches de cette espèce. Cette approche soulignait aussi la diversité génétique au sein de l'espèce *S. xylosus* puisque 5 profils distincts ont été observés parmi les souches de *S. xylosus*. Les 20 autres souches sauvages avaient des profils RAPD différents.
- L'amplification par RAPD a révélé l'existence d'un fragment de 539 pb commun à toutes les souches de *S. xylosus* de référence. Ce fragment était aussi observé chez les 7 souches sauvages possédant des profils PFGE et RAPD proches. Ce fragment était absent chez les autres espèces de staphylocoques testées. Après purification, clonage et séquençage de ce fragment, un couple d'amorces permettant l'amplification de ce fragment par PCR a été déterminé.
- Ces amorces, testées sur 21 souches de référence appartenant à différentes espèces de *Staphylococcus*, amplifiaient uniquement l'ADN des souches de *S. xylosus* de référence. Ceci a permis de valider ces amorces comme étant spécifiques de l'espèce *S. xylosus*. Leur utilisation a confirmé que les sept souches sauvages ayant des profils PFGE et RAPD identiques ou proches à ceux des souches de référence de *S. xylosus* appartenaient bien à l'espèce *S. xylosus*.

Développement d'une PCR multiplex genre-espèces (article 2)

- Les conditions d'amplification utilisant les amorces spécifiques à *S. xylosus* et la taille du fragment amplifié se sont révélées compatibles avec celles utilisant les amorces spécifiques pour identifier le genre *Staphylococcus* et les espèces *S. aureus*, *S. epidermidis* et *S. saprophyticus* ainsi qu'avec la taille des fragments amplifiés dans chacune des conditions.
- Ces cinq couples d'amorces utilisés dans une même réaction PCR ont permis d'obtenir, après optimisation des conditions d'amplification, des produits spécifiques de taille distincte permettant une bonne interprétation des résultats. La spécificité de la PCR multiplex genre-espèces a été validée sur 40 espèces et sous-espèces de staphylocoques et des souches de référence appartenant aux genres *Kocuria*, *Macrococcus* et *Micrococcus*, autres coques à Gram positif et catalase positive.
- Cette PCR multiplex a été appliquée à l'identification de 30 souches de coques à Gram positif et catalase positive isolées de saucissons et de l'environnement d'ateliers producteurs de salaisons. Cette analyse a montré que 28 souches appartenaient au genre *Staphylococcus*, dont 14 à l'espèce *S. saprophyticus*, quatre à l'espèce *S. xylosus*, deux à l'espèce *S. aureus* et une à l'espèce *S. epidermidis*. Sept souches de staphylocoques restaient non identifiées au niveau de l'espèce.

Article n°1

Stéphanie Morot-Bizot, Régine Talon, Sabine Leroy

**Development of specific PCR primers for a rapid and accurate identification of
Staphylococcus xylosus, a species used in food fermentation**

Journal of Microbiological Methods (2003)

Development of specific PCR primers for a rapid and accurate identification of *Staphylococcus xylosus*, a species used in food fermentation

Stephanie Morot-Bizot, Régine Talon, Sabine Leroy-Setrin*

Station de Recherches sur la Viande, INRA, Theix, 63122 Saint-Genès Champanelle, France

Received 10 December 2002; received in revised form 29 April 2003; accepted 29 April 2003

Abstract

Twenty-seven *Staphylococcus* strains isolated from food and food environments were assigned to *Staphylococcus xylosus* by API-Staph system. But only seven isolates had similar patterns to this species when compared to the pulse-field gel electrophoresis patterns of 12 *S. xylosus* strains. To perform a rapid identification of the *S. xylosus* species, a random amplified polymorphic DNA product of 539-bp shared by all of the *S. xylosus* strains was used to design a pair of primers. These primers were species-specific for *S. xylosus* when tested by PCR on 21 staphylococci species. This specific PCR assay confirms the identification of the seven isolates identified by PFGE to *S. xylosus*. In conclusion, we developed specific PCR primers for a rapid and accurate identification of the *S. xylosus* species.

© 2003 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: PCR primers; Pulse-field gel electrophoresis; Random amplified polymorphic DNA; *Staphylococcus xylosus*

1. Introduction

Among the Coagulase Negative Staphylococci (CNS), *Staphylococcus xylosus* is a species isolated in many food products and is also used as starter for the manufacture of fermented sausages (Lücke and Hechelmann, 1987). It ensures colour formation during sausage ripening and contributes to aroma development (Berdagué et al., 1993; Talon et al., 1999). *S. xylosus* is one of the prevalent staphylococci species found in naturally fermented products and environment of traditional workshops manufacturing dry sausage

without using starters (Montel et al., 1992; Rebecchi et al., 1998).

Phenotypic identification of *S. xylosus* strains isolated from food environments is problematic because of the limited number of stable discriminating characteristics to distinguish one staphylococcal species from another (Takahashi et al., 1997; Bascomb and Manafi, 1998; Rossi et al., 2001). Furthermore, there is a high heterogeneity within the *S. xylosus* species (García-Varona et al., 2000; Villard et al., 2000). For these reasons, several typing methods based on molecular techniques have been used to improve the species determination of the *S. xylosus* strains: ribotyping analysis (De Buyser et al., 1989; Villard et al., 2000), PCR amplification of the 16S–23S spacer region (Villard et al., 2000; Rossi et al., 2001), pulse-field gel electro-

* Corresponding author. Tel.: +33-4-73-62-45-95; fax: +33-4-73-62-42-68.

E-mail address: sleroy@clermont.inra.fr (S. Leroy-Setrin).

phoresis (PFGE) (Snopkova et al., 1994; Di Maria et al., 2002) and random amplified polymorphic DNA (RAPD) (Rossi et al., 2001; Di Maria et al., 2002). All of these methods generated characteristic patterns of *S. xylosus* strains and can distinguish *S. xylosus* among different staphylococcal species. But none is suitable for a rapid and easy identification of this species among CNS isolated from food products. In this study, we present the development of PCR primers species-specific of *S. xylosus*. A RAPD protocol was used to find a common fingerprinting product of 539-bp shared by a panel of strains of *S. xylosus* but not encountered in other CNS. This DNA fragment was sequenced and used to design a pair of PCR primers suitable for the specific identification of the *S. xylosus* species.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains

The 27 *Staphylococcus* strains studied were isolated from different food environments (Table 1). All of these strains were identified as *S. xylosus* by the API-Staph system (bioMérieux, Lyon, France). The *S. xylosus* type strain DSM 20266 (DSM: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen) and 11 strains well identified to this species were used as references (Table 1).

Twenty-one *Staphylococcus* species were used to check the specificity of the *S. xylosus* PCR primers: *S. arlettae* CIP 103501 (CIP: Collection Institut Pasteur), *S. aureus* ATCC 25923 (ATCC: American Type Culture Collection), *S. aureus* CIP 65.8 T, *S. auricularis* DSM 20609, *S. capitis* CIP 104192 T, *S. caprae* CIP 104000 T, *S. carnosus* DSM 20501, *S. cohnii* DSM 20260, *S. epidermidis* DSM 20042, *S. equorum* DSM 20674, *S. haemolyticus* CIP 81.56T, *S. hominis* CIP 81.57, *S. intermedius* CIP 81.60 T, *S. kloosii* DSM 20676, *S. lentus* CIP 81.63T, *S. pasteurii* CIP 103540 T, *S. piscifermentans* CIP 103958 T, *S. saprophyticus* DSM 76125 T, *S. sciuri* CIP 81.62 T, *S. simulans* DSM 20322, *S. vitulinus* CIP 104850 T and *S. warneri* CIT 863 (CIT: Collection INRA, Theix).

The strains were grown at 37 °C on Brain Heart Infusion (BHI) agar or in BHI broth (Difco, Detroit, USA).

2.2. PFGE analysis

A suspension of staphylococcal culture at optical density of 1 at 600 nm was centrifuged and resuspended in 0.5 volume of TEE buffer (Tris 10 mM pH 9, EDTA 100 mM, EGTA 10 mM). The suspension of bacteria was mixed in a ratio of 1:1 with 2.0% low-melting-point agarose (GIBCO, Cergy Pontoise, France). Agarose plugs were incubated with 40 µg ml⁻¹ of lysostaphin (Sigma, St. Quentin, France), 0.05% sarkosyl and 5 mg ml⁻¹ of lysozyme (Eurobio, les Ullis, France) at 37 °C for 2 h. Then, they were lysed overnight in TEE buffer containing 1% of sodium dodecyl sulfate and 1 mg ml⁻¹ of proteinase K (Eurobio) at 55 °C. Plugs were washed three times for 1 h each, once in TE buffer (Tris 10 mM pH 8, EDTA 1 mM) containing 20 mM of phenylmethylsulfonyl fluoride and twice in TE buffer. They were stored at 4 °C. DNA within half a plug was digested by 25 U of *Apa*I for 16 h at 25 °C (Promega, Lyon Charbonnières, France) or *Sma*I (Roche, Meylan, France) for 16 h at 25 °C. Pulse field gel electrophoresis was performed in 1% agarose using a CHEF-DRIII apparatus (Bio-Rad, Ivry, France) in 0.5 X Tris–borate–EDTA buffer pH 8.3 (TBE) at 6 V cm⁻¹ at 14 °C. Pulse times increased from 10 to 30 s over 23 h. Lambda ladder (Bio-Rad) was used as molecular weight marker. Gels were stained with ethidium bromide and digitalized with the Gel Doc 2000 apparatus (Bio-Rad).

2.3. Preparation of lysates

Staphylococcus strains were grown 5 h at 37 °C in BHI broth under 200 rpm stirring. Fifty microliters of culture (optical density of 0.5 at 600 nm) were lysed in 200 µl of TES buffer (Tris 50 mM pH 8.0, EDTA 1 mM, Sucrose 25%) for 10 min at 95 °C. The lysates were stored frozen at –20 °C.

2.4. RAPD amplification

The 10-mer primer 5 (5'AAC GCG CAA C 3') was used (Wieser and Busse, 2000). The RAPD was carried out from 10 µl of staphylococcal lysate. DNA was amplified in 15 µl volume mix containing 1.3 µM primer, 200 µM of each deoxynucleotide triphosphate, 3 mM MgCl₂ and 1.25 unit of Taq DNA polymerase in

Table 1
Phenotypic and genotypic identifications of the *S. xylosus* strains and *Staphylococcus* strains isolated from food environments

Strain	Origin	PFGE type		RAPD type	Amplification by PCR
		<i>Apa</i> I	<i>Sma</i> I		
<i>S. xylosus</i> DSM 20266	Type strain	A	I	a	+
<i>S. xylosus</i> C2a ^a	University of Tübingen	A2	Ia	a3	+
<i>S. xylosus</i> CIT M203	Starter culture	A1	I	a	+
<i>S. xylosus</i> CIT M505	Starter culture	ND ^b	Ib	a2	+
<i>S. xylosus</i> CIT S01-003	Starter culture	A3	Ic	a3	+
<i>S. xylosus</i> CIT S01-004	Starter culture	A4	Id	a1	+
<i>S. xylosus</i> CIT S01-005	Starter culture	A4	nd ^c	a1	+
<i>S. xylosus</i> CIT S01-006	Starter culture	A3	nd	a3	+
<i>S. xylosus</i> CIT S01-007	Starter culture	A3	nd	a3	+
<i>S. xylosus</i> CIT S01-008	Starter culture	A4	nd	a3	+
<i>S. xylosus</i> CIT 839	Starter culture	ND	Ib	a3	+
<i>S. xylosus</i> CIT 840	Starter culture	A5	Ig	a3	+
CIT S01-009	Dairy product	A6	Ie	a4	+
CIT S01-010	Dairy product	C	II	c	–
CIT S01-011	Dairy product	D	nd	d	–
CIT S01-012	Dairy product	E	nd	e	–
CIT S01-013	Dairy product	F	III	f	–
CIT 837	Dry sausage	B	IV	b	–
CIT S02-001	Dry sausage	A5	If	a3	+
CIT S02-002	Dry sausage	A5	nd	a3	+
CIT S02-003	Dry sausage	A5	nd	a3	+
CIT S02-004	Dry sausage	A5	If	a3	+

Table 1 (continued)

Strain	Origin	PFGE type		RAPD type	Amplification by PCR
		<i>Apa</i> I	<i>Sma</i> I		
CIT S02-005	Dry sausage	A7	Ih	a3	+
CIT S02-006	Dry sausage	A5	If	a3	+
CIT S00-027	Dry sausage	L	VII	g	–
CIT S00-032	Dry sausage	I	IX	h	–
CIT S00-033	Dry sausage	I	IX	h	–
CIT S00-034	Dry sausage	J	VI	g	–
CIT S00-036	Dry sausage	J	VI	g	–
CIT S00-004	Environment ^d	G	V	g	–
CIT S00-005	Environment	H	nd	g	–
CIT S00-009	Environment	I	IX	h	–
CIT S00-010	Environment	J	VI	g	–
CIT S00-012	Environment	I	IX	h	–
CIT S00-014	Environment	I	IX	h	–
CIT S00-016	Environment	K	nd	i	–
CIT S00-018	Environment	H	nd	j	–
CIT S00-020	Environment	I	IX	h	–
CIT S00-041	Environment	M	nd	g	–

^a Strain derivative of *S. xylosus* DSM20267, cured of its endogenous plasmid pSX267 (Götz et al., 1983).

^b ND: non-determinable.

^c nd: non-done.

^d *Staphylococcus* strains isolated from the environment of a workshop manufacturing naturally fermented dry sausage.

1 × buffer according to the manufacturer's instructions (Promega). The samples were subjected to thermal cycling program: 5 min at 94 °C and then 40 cycles of 30 s at 94 °C for the denaturation step, 30 s at 35 °C for the annealing step, and 1 min 30 s at 72 °C for the extension step with a GenAmp[®] PCR system 9700 PE thermal cycler (Perkin-Elmer, Courtaboeuf, France). A final extension step of 7 min at 72 °C was performed. RAPD fragment fingerprints were

analysed by electrophoresis in 1.5% agarose gels in $1 \times$ TBE buffer pH 8.3. The gels were visualized as described above. The sizes of the RAPD products were estimated by comparison with a 100-bp-molecular-size DNA ladder (Promega). RAPD assays were performed at least three times each to check reproducibility. Each reaction included a control tube without template DNA.

2.5. Synthesis of the specific primers

A 539-bp RAPD product amplified from *S. xylosus* CIT M203 DNA lysate was extracted and purified from the gel by using the QIAquick gel extraction kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). The purified fragment was then cloned into the PGEM-T easy vector system (Promega). Recombinant plasmids were isolated from transformed *Escherichia coli* TG1 strain by using the Qiagen plasmid mini kit (Qiagen). The presence of the 539-bp insert was confirmed by digestion of the plasmids with *EcoRI* (Roche). The 539-bp insert for the selected recombinant plasmid was labelled with the Dig-High Prime system (Roche) and used as a probe to hybridize a Southern blot of RAPD patterns. The hybridized probe was detected by the Dig luminescent detection kit (Roche). Both strands of the 539-bp DNA insert were sequenced with the 'BigDye terminator cycle sequencing ready reaction' kit with an automatic DNA sequencer 'ABI PRISM 310' (Perkin-Elmer). The 539-bp sequence was used to design a pair of primers specific of the *S. xylosus* species. These primers were designed by MWG-Biotech (Ebersberg, Germany).

2.6. Conventional PCR amplification

Amplifications were performed from 5 µl of staphylococcal lysates. The 20 µl-PCR mixture contained 0.2 µM (each) of the two *S. xylosus*-specific primers XYL F 5'-AAC GCG CAA CGT GAT AAA ATT AAT G-3' (annealing positions 1–25) and XYL R 5'-AAC GCG CAA CAG CAA TTA CG-3' (520–539), 200 µM of each deoxyribonucleoside triphosphate (Eurobio), 1.5 mM MgCl₂ and 1.25 U of *Taq* DNA polymerase in $1 \times$ buffer according to the manufacturer's instructions (Promega). PCR was performed under the following conditions: 5 min at 94 °C, then 40 cycles of 30 s at 94 °C, 30 s at 57 °C, 45 s at 72 °C and a final hold

of 7 min at 72 °C. Five microliters of the PCR reaction mixture was analysed by electrophoresis through a 1.5% agarose gel as described above.

2.7. Nucleotide sequence accession number

The nucleotide sequence of the *S. xylosus*-specific DNA fragment is available from GenBank as accession no. [AY157732](#).

3. Results

3.1. PFGE analysis of the *S. xylosus* strains and food isolates

All of the *S. xylosus* strains and the *Staphylococcus* strains isolated from food environments and identified by the API-Staph system as *S. xylosus* were analysed by PFGE. Among the 39 strains typed by PFGE with *ApaI*, 13 different patterns (A–M) were obtained (Table 1, Fig. 1). The *ApaI* PFGE profile of the *S. xylosus* type strain (DSM 20266) was designated A and the profiles of the strains that showed similar PFGE patterns from the one of the type strain were designated A1–A7 (Table 1). Nine of the eleven *S. xylosus* strains used as references gave a similar PFGE profile with the type strain pattern (A1–A5), the two other strains being nontypable by *ApaI* PFGE. Amongst the *Staphylococcus* strains isolated from food environments, only 7 on 27 strains showed identical or closely similar *ApaI* PFGE patterns with those of the *S. xylosus* strains (A5–A7). If these results are interpreted on the basis of guidelines issued previously (Tenover et al., 1995), these seven strains belong to the *S. xylosus* species. The other strains showed different PFGE patterns with those of the *S. xylosus* strains and were designated B–M (Table 1). It appeared that these 20 isolates identified by the API-Staph system as *S. xylosus* could not belong to the *S. xylosus* species. The *ApaI* PFGE analysis revealed a high diversity within the *S. xylosus* strains and the food isolates.

Among the 27 strains typed by *SmaI* PFGE, the *S. xylosus* reference strains CIT M505 and CIT 839, nontypable by *ApaI* analysis, were clearly similar to the *S. xylosus* type strain (Table 1). Concerning the isolates tested, five strains closely similar to *S. xylosus* by *ApaI* PFGE were also similar to the *S. xylosus* type

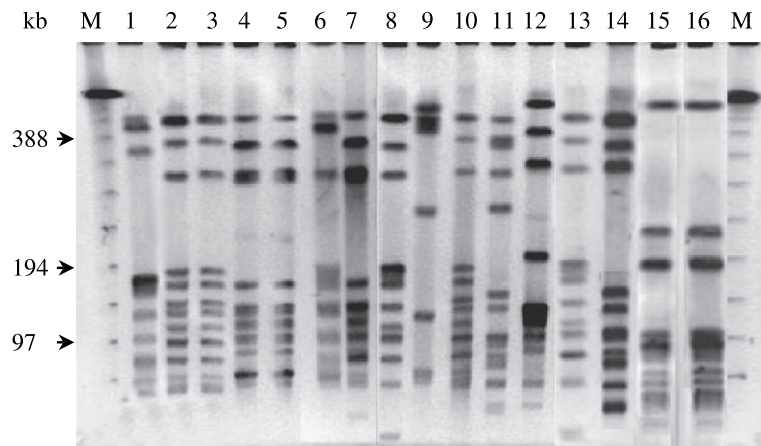


Fig. 1. PFGE data obtained for *Staphylococcus* strains with *Apa*I. Lanes M: DNA size Lambda standard (Bio-Rad); lane 1: *S. xylosus* DSM 20266; lane 2: *S. xylosus* CIT S01-006; lane 3: *S. xylosus* CIT S01-007; lane 4: *S. xylosus* CIT S01-008; lane 5: *S. xylosus* CIT S01-005; lane 6: *S. xylosus* C2a; lane 7: *S. xylosus* CIT S01-004; lane 8: *S. xylosus* CIT 840; lane 9: CIT 837; lane 10: *S. xylosus* CIT S01-003; lane 11: CIT S01-009; lane 12: CIT S01-010; lane 13: CIT S02-004; lane 14: CIT S02-005; lane 15: CIT S00-009; lane 16: CIT S00-014.

strain by *Sma*I PFGE analysis. The 14 remain isolates were not similar to *S. xylosus* by *Sma*I analysis, confirming the results obtained with *Apa*I analysis.

3.2. Isolation of a *S. xylosus* specific DNA fragment by RAPD

The primer 5 used for the RAPD analysis was selected among ten different RAPD primers for its ability to generate distinct and reproducible RAPD profiles among the different strains of *Staphylococcus*

studied (data not shown). Control assays in which no template DNA was present yielded no detectable amplified product. The RAPD assays underlined the diversity of fingerprints among the 19 *S. xylosus* strains (type and reference strains, and isolates confirmed as *S. xylosus* by PFGE analysis) (Table 1). These 19 strains exhibited five related profiles of two to six fragments of variable intensity ranging from about 540–1400 bp (Fig. 2). The 20 other isolates exhibited different and various patterns (Table 1, Fig. 2). Thus, RAPD assays and PFGE analysis yielded

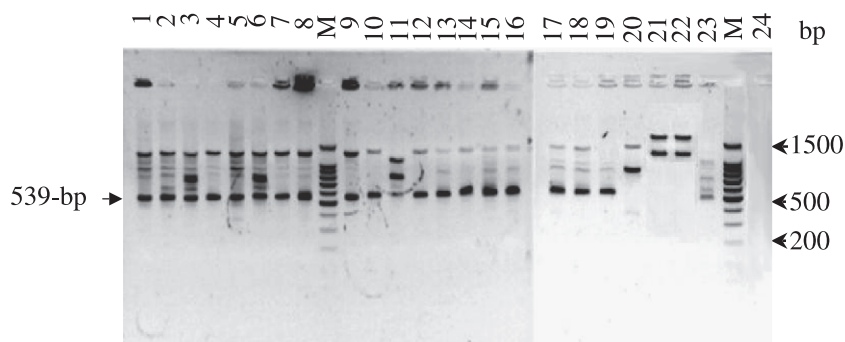


Fig. 2. RAPD analysis of *Staphylococcus* strains. Lanes M: 100-bp-molecular-size DNA ladder (Promega); lane 1: *S. xylosus* CIT S01-004; lane 2: *S. xylosus* CIT M505; lane 3: *S. xylosus* CIT M203; lane 4: *S. xylosus* C2a; lane 5: *S. xylosus* CIT S01-005; lane 6: *S. xylosus* DSM 20266; lane 7: *S. xylosus* CIT S01-006; lane 8: *S. xylosus* CIT S01-007; lane 9: *S. xylosus* CIT S01-003; lane 10: *S. xylosus* CIT S01-008; lane 11: CIT 837; lane 12: *S. xylosus* CIT 839; lane 13: *S. xylosus* CIT 840; lane 14: CIT S02-001; lane 15: CIT S02-002; lane 16: CIT S02-003; lane 17: CIT S02-004; lane 18: CIT S02-005; lane 19: CIT S01-009; lane 20: CIT S00-018; lane 21: CIT S00-032; lane 22: CIT S00-033; lane 23: CIT S01-013; lane 24: negative control. The *S. xylosus* common 539-bp fragment is highlighted.

concordant results. However, PFGE was more discriminant than RAPD.

All the RAPD patterns of the *S. xylosus* strains (type and reference strains and isolates confirmed as *S. xylosus* by PFGE analysis) showed a common fragment of 539 bp (Fig. 2). This fragment was absent from the RAPD patterns of the other staphylococcal species tested (data not shown). This potential *S. xylosus*-specific DNA fragment was amplified from *S. xylosus* CIT M203, gel purified and cloned into pGEM-T. This fragment hybridized with the 539-bp RAPD product of all of the *S. xylosus* strains (data not shown). Subsequently, the sequence of both strands of this fragment was determined. The analysis of this sequence revealed that a part of the 539-bp fragment, corresponding to the position 293–535, presented 61% similarity, at the amino acid level, to a hypothetical regulatory protein of *S. aureus*, PfoR. One set of PCR primers, XYL F and XYL R, derived from this sequence was designed.

3.3. PCR assays

Specificity tests performed with the 21 *Staphylococcus* species showed that the selected PCR primers amplified only DNA from the *S. xylosus* strains (type and reference strains and isolates confirmed as *S. xylosus* by PFGE analysis) (Table 1, Fig. 3). The negative PCR results were not attributable to PCR inhibitors as all cell lysates were amplified by the universal bacterial

primers for the 16S rDNA gene (Greisen et al., 1994) (data not shown).

4. Discussion

It is important to accurately identify *S. xylosus* because this species is involved in the quality of fermented products. Of the 27 CNS isolated from food environments and identified as *S. xylosus* by Api-Staph system, only seven were identified to this species by PFGE analysis and specific PCR. The remaining 20 strains were misidentified. PFGE analysis and specific PCR confirmed that they did not belong to the *S. xylosus* species. This result is in agreement with Goh et al. (1996) that observed that 7 of 20 clinical isolates of CNS were misidentified by commercially systems based on phenotypic characterization. Coppola et al. (2000) obtained 82% of staphylococcal food isolates unidentified by the API-Staph system. Finally, Rossi et al. (2001) encountered problems with phenotypic identification of *S. xylosus* strains isolated from naturally fermented sausage. In contrast, Garcia-Varona et al. (2000) and Di maria et al. (2002) obtained concordance between phenotypic and genotypic identifications. Although phenotypic methods are easy to use, they are often insufficient for an accurate identification of the CNS species such as *S. xylosus*.

The introduction of molecular methods has improved the accuracy of the identification at the species

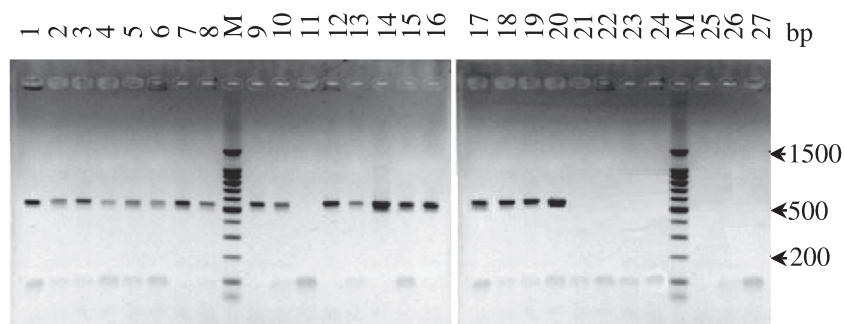


Fig. 3. PCR amplification with the *S. xylosus*-specific primer pair XYL F and XYL R. Lanes M: 100-bp-molecular-size DNA ladder (Promega); lane 1: *S. xylosus* DSM 20266; lane 2: *S. xylosus* C2a; lane 3: *S. xylosus* CIT M203; lane 4: *S. xylosus* CIT M505; lane 5: *S. xylosus* CIT S01-003; lane 6: *S. xylosus* CIT S01-004; lane 7: *S. xylosus* CIT S01-005; lane 8: *S. xylosus* CIT S01-006; lane 9: *S. xylosus* CIT S01-007; lane 10: *S. xylosus* CIT S01-008; lane 11: CIT 837; lane 12: *S. xylosus* CIT 839; lane 13: *S. xylosus* CIT 840; lane 14: CIT S02-001; lane 15: CIT S02-002; lane 16: CIT S02-003; lane 17: CIT S02-004; lane 18: CIT S02-005; lane 19: CIT S02-006; lane 20: CIT S01-009; lane 21: CIT S01-010; lane 22: CIT S01-011; lane 23: CIT S00-033; lane 24: *S. carnosus* DSM 20501; lane 25: *S. saprophyticus* DSM 76125 T; lane 26: *S. sciuri* CIP 81.62 T; lane 27: *S. hominis* CIP 81.57.

level. For instance, PFGE analysis allowed the clustering within CNS species (Snopkova et al., 1994). It is widely used for typing and subtyping the CNS strains such as *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. schleiferi* and for the *S. aureus* strains (Linhardt et al., 1992; Kumari et al., 1997; Kluytmans et al., 1998; Mulvey et al., 2001). We have performed PFGE analysis in order to check the phenotypic identification of 27 staphylococci isolated from food environments. On top of the fact that this technique revealed the lack of accuracy of the API-Staph system, it showed a wide diversity among the CNS strains and in particular among the *S. xylosus* species, as shown by Snopkova et al. (1994) and Di Maria et al. (2002). But as PFGE is time-consuming, we focused on genotypic methods which could allow the development of rapid tools for specific identification of the *S. xylosus* strains. On this aim, RAPD seemed to be suitable. This method emphasized the wide heterogeneity among the *S. xylosus* strains, as previously described with the same approach (Rossi et al., 2001; Di Maria et al., 2002). Because of the wide heterogeneity among the *S. xylosus* strains and the difficulty to interpret RAPD patterns, RAPD cannot be used for a rapid identification of this species. But RAPD allowed the identification of a 539-bp fragment shared by all of the *S. xylosus* strains but by none of the other CNS type species studied. Thus, specific PCR primers were designed from the 539-bp RAPD product and can be used to identify all of the *S. xylosus* strains. The results obtained with PFGE and RAPD analyses and specific PCR were well correlated.

Until now no specific primers have been developed for the identification of *S. xylosus* strains isolated from food and food environments. Some species-specific primers are described for the direct identification of *Staphylococcus* species of clinical interest such as *S. epidermidis*, *S. aureus* and *S. saprophyticus* (Martineau et al., 1996, 1998, 2000). Forsman et al. (1997) developed PCR using primers designed in the 16S–23S rDNA spacer region for the identification of some staphylococcal species involved in bovine mastitis. Martineau et al. (2001) developed a *tuf*-based PCR assay for the identification of *S. epidermidis*, *S. aureus*, *S. haemolyticus*, *S. hominis* and *S. saprophyticus* but it needs to be coupled with hybridization with species-specific probes. Poyart et al. (2001) described PCR primers designed from the *sodA* gene in order to characterize 40 CNS species, including the *S. xylosus* spe-

cies. But this discriminative approach needs sequencing of all the *sodA* amplified products to allow the identification. Consequently, it is not suitable for a rapid identification of a wide collection of strains isolated from food environments.

In conclusion, we developed a pair of specific primers for the *S. xylosus* species which allows a rapid and accurate identification of this species within *Staphylococcus* isolated from food environments.

References

- Bascomb, S., Manafi, M., 1998. Use of enzyme tests in characterization and identification of aerobic and facultative anaerobic Gram-positive cocci. Clin. Microbiol. Rev. 11, 318–340.
- Berdagué, J.L., Monteil, P., Montel, M.C., Talon, R., 1993. Effects of starter cultures on the formation of flavour compounds in dry sausage. Meat Sci. 35, 275–287.
- Coppola, S., Mauriello, G., Aponte, M., Moschetti, G., Villani, F., 2000. Microbial succession during ripening of Naples-type salami, a southern Italian fermented sausage. Meat Sci. 56, 321–329.
- De Buyser, M.L., Morvan, A., Grimont, F., El Solh, N., 1989. Characterization of *Staphylococcus* species by ribosomal RNA gene restriction patterns. J. Gen. Microbiol. 135, 989–999.
- Di Maria, S., Basso, A.L., Santoro, E., Grazia, L., Coppola, R., 2002. Monitoring of *Staphylococcus xylosus* DSM 20266 added as starter during fermentation and ripening of soppressata molisana, a typical Italian sausage. J. Appl. Microbiol. 92, 158–164.
- Forsman, P., Tilsala-Timisjarvi, A., Alatosava, T., 1997. Identification of staphylococcal and streptococcal causes of bovine mastitis using 16S–23S rRNA spacer regions. Microbiology 143, 3491–3500.
- Garcia-Varona, M., Santos, E.M., Jaime, I., Rovira, J., 2000. Characterisation of *Micrococcaceae* isolated from different varieties of chorizo. Int. J. Food Microbiol. 54, 189–195.
- Goh, S., Potter, S., Wood, J., Hemmingsen, S., Reynolds, R., Chow, A., 1996. HSP60 gene sequences as universal targets for microbial species identification: studies with coagulase-negative staphylococci. J. Clin. Microbiol. 34, 818–823.
- Götz, F., Zabielski, J., Philipson, L., Lindberg, M., 1983. DNA homology between the arsenate resistance plasmid pSX267 from *Staphylococcus xylosus* and the penicillinase plasmid pI258 from *Staphylococcus aureus*. Plasmid 9, 126–137.
- Greisen, K., Loeffelholz, M., Purohit, A., Leong, D., 1994. PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid. J. Clin. Microbiol. 32, 335–351.
- Kluytmans, J., Berg, H., Steegh, P., Vandenesch, F., Etienne, J., van Belkum, A., 1998. Outbreak of *Staphylococcus schleiferi* wound infections: strain characterization by randomly amplified polymorphic DNA analysis, PCR ribotyping, conventional ribotyping, and pulsed-field gel electrophoresis. J. Clin. Microbiol. 36, 2214–2219.
- Kumari, D., Keer, V., Hawkey, P., Parnell, P., Joseph, N., Richardson,

- J., Cookson, B., 1997. Comparison and application of ribosome spacer DNA amplicon polymorphisms and pulsed-field gel electrophoresis for differentiation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. J. Clin. Microbiol. 35, 881–885.
- Linhardt, F., Ziebuhr, W., Meyer, P., Witte, W., Hacker, J., 1992. Pulse-field gel electrophoresis of genomic restriction fragments as a tool for the epidemiological analysis of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. FEMS Microbiol. Lett. 95, 181–186.
- Lücke, F.K., Hechelmann, H., 1987. Starter cultures for dry sausages and raw ham: composition and effect. Fleischwirtschaft 67, 307–314.
- Martineau, F., Picard, F., Roy, P., Ouellette, M., Bergeron, M., 1996. Species-specific and ubiquitous DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus epidermidis*. J. Clin. Microbiol. 34, 2888–2893.
- Martineau, F., Picard, F.J., Roy, P.H., Ouellette, M., Bergeron, M.G., 1998. Species-specific and ubiquitous-DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol. 36, 618–623.
- Martineau, F., Picard, F.J., Menard, C., Roy, P.H., Ouellette, M., Bergeron, M.G., 2000. Development of a rapid PCR assay specific for *Staphylococcus saprophyticus* and application to direct detection from urine samples. J. Clin. Microbiol. 38, 3280–3284.
- Martineau, F., Picard, F.J., Ke, D., Paradis, S., Roy, P.H., Ouellette, M., Bergeron, M.G., 2001. Development of a PCR assay for identification of staphylococci at genus and species levels. J. Clin. Microbiol. 39, 2541–2547.
- Montel, M.C., Talon, R., Cantonnet, M., Fournaud, J., 1992. Identification of *Staphylococcus* from French dry sausage. Lett. Appl. Microbiol. 15, 73–77.
- Mulvey, M.R., Chui, L., Ismail, J., Louie, L., Murphy, C., Chang, N., Alfa, M., Canadian Committee for the Standardization of Molecular Methods, 2001. Development of a Canadian standardized protocol for subtyping methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using pulsed-field gel electrophoresis. J. Clin. Microbiol. 39, 3481–3485.
- Poyart, C., Quesne, G., Boumaila, C., Trieu-Cuot, P., 2001. Rapid and accurate species-level identification of coagulase-negative staphylococci by using the *sodA* gene as a target. J. Clin. Microbiol. 39, 4296–4301.
- Rebecchi, A., Crivori, S., Sarra, P.G., Cocconcelli, P.S., 1998. Physiological and molecular techniques for the study of bacterial community development in sausage fermentation. J. Appl. Microbiol. 84, 1043–1049.
- Rossi, F., Tofalo, R., Torriani, S., Suzzi, G., 2001. Identification by 16S–23S rDNA intergenic region amplification, genotypic and phenotypic clustering of *Staphylococcus xylosus* strains from dry sausages. J. Appl. Microbiol. 90, 365–371.
- Snopkova, S., Götz, F., Doskar, J., Rosypal, S., 1994. Pulse-field gel electrophoresis of the genomic restriction fragments of coagulase-negative staphylococci. FEMS Microbiol. Lett. 124, 131–140.
- Takahashi, T., Kaneko, M., Mori, Y., Tsuji, M., Kikuchi, N., Hiramune, T., 1997. Phylogenetic analyses of *Staphylococcus* based on the 16S rDNA sequence and assignment of clinical isolates from animals. J. Vet. Med. Sci. 59, 775–783.
- Talon, R., Walter, D., Chartier, S., Barrière, C., Montel, M.C., 1999. Effect of nitrate and incubation conditions on the production of catalase and nitrate reductase by staphylococci. Int. J. Food Microbiol. 52, 47–56.
- Tenover, F., Arbeit, R., Goering, R., Mickelsen, P., Murray, B., Persing, D., Swaminathan, B., 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J. Clin. Microbiol. 33, 2233–2239.
- Villard, L., Kodjo, A., Borges, E., Maurin, F., Richard, Y., 2000. Ribotyping and rapid identification of *Staphylococcus xylosus* by 16–23S spacer amplification. FEMS Microbiol. Lett. 185, 83–87.
- Wieser, M., Busse, H.J., 2000. Rapid identification of *Staphylococcus epidermidis*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 50, 1087–1093.

Article n°2

Stéphanie Corbière Morot-Bizot, Régine Talon, Sabine Leroy

Development of a multiplex PCR for the identification of *Staphylococcus* genus and four staphylococcal species isolated from food

Journal of Applied Microbiology (2004)

Development of a multiplex PCR for the identification of *Staphylococcus* genus and four staphylococcal species isolated from food

S. Corbiere Morot-Bizot, R. Talon and S. Leroy

Station de Recherches sur la Viande, INRA, Centre Clermont-ferrand-Theix, Saint-Genès Champanelle, France

2004/0193: received 20 February 2004, revised 25 May 2004 and accepted 14 June 2004

ABSTRACT

S.C. MOROT-BIZOT, R. TALON AND S. LEROY. 2004.

Aims: To develop a multiplex PCR that allows the identification of bacteria belonging to the *Staphylococcus* genus and in particular to the species *Staphylococcus xylosus*, *S. saprophyticus*, *S. epidermidis* and *S. aureus* isolated from food manufacturing plants.

Methods and Results: Five primer pairs were used in the multiplex PCR, one specific to the *Staphylococcus* genus and four specific to *S. xylosus*, *S. saprophyticus*, *S. epidermidis* and *S. aureus* species. All the 31 *Staphylococcus* reference strains yielded a specific PCR product with the genus-specific primers. *Staphylococcus xylosus*, *S. saprophyticus*, *S. epidermidis* and *S. aureus* gave a specific PCR fragment with the corresponding species-specific primers. No amplification with the *Kocuria*, *Macrococcus* and *Micrococcus* strains was observed in our conditions. This multiplex PCR was performed on 30 strains of Gram-positive cocci isolated from different workshops and fermented sausages. Among them, 28 belonged to the *Staphylococcus* genus and 14 were identified to *S. saprophyticus*, four to *S. xylosus*, two to *S. aureus* and one to *S. epidermidis*.

Conclusions: This multiplex PCR provided reliable and repeatable PCR results. It allowed the identification of a major part of the isolates, highlighting the predominance of the *S. saprophyticus* species in the workshops studied.

Significance and Impact of the Study: This tool is a useful way to screen the strains isolated from foodstuff and food environment and to monitor these species during the food processing.

Keywords: multiplex PCR, *S. aureus*, *S. epidermis*, *S. saprophyticus*, *S. xylosus*.

INTRODUCTION

Staphylococci are found to be natural hosts of skin and mucous membranes of warm-blooded animals, but they are also isolated from a wide range of foodstuff such as meat, cheese or milk and from environmental sources such as soil, sand, dust, air or natural water (Kloos and Schleifer 1986). Among the *Staphylococcus* genus, *S. xylosus* and *S. saprophyticus* are frequently isolated from foodstuff, whereas *S. epidermidis* and *S. aureus* are occasionally isolated.

Staphylococcus xylosus is isolated from goat milk (Deinhofer and Pernthaner 1995) or ewe cheese (Cáceres *et al.* 1997) and is involved in the fermentation of raw fermented sausages (Samelis *et al.* 1998; Di Maria *et al.* 2002; Blaiotta *et al.* 2003a; Morot-Bizot *et al.* 2003; Mauriello *et al.* 2004). *Staphylococcus saprophyticus*, *S. epidermidis* and *S. aureus* can be isolated from soaked cod (Rodriguez *et al.* 1996), dry-fermented sausages (Blaiotta *et al.* 2003a), dry-cured lãcon (Vilar *et al.* 2000) or goat milk (Deinhofer and Pernthaner 1995), but these species are known to be pathogens or opportunistic pathogens. Samelis *et al.* (1998) reported that *S. saprophyticus* could contribute to sausage aromatization and Mauriello *et al.* (2004) suggested that this species 'could help to prevent off-flavour during sausage ripening'.

Correspondence to: Sabine Leroy, Station de Recherches sur la Viande, INRA, centre Clermont-ferrand-Theix, 63122 Saint-Genès Champanelle, France (e-mail: sleroy@clermont.inra.fr).

Nevertheless, this species is also the predominant staphylococcal species involved in acute urinary tract infections (UTI) of young adult woman (Martineau *et al.* 2000) and it has to be considered with caution. *Staphylococcus epidermidis* is involved in many infections such as bacteraemia, prosthetic and natural valvular endocarditis, osteomyelitis, UTI and peritonitis (Martineau *et al.* 2001). *Staphylococcus aureus* is responsible for staphylococcal toxin-mediated food poisoning, toxic shock syndrome and for some pyogenic infections (Drancourt and Raoult 2002).

As they are widely spread in various niches such as clinical environment and food manufacturing plants, it has become increasingly important to accurately identify the staphylococci at the genus and species levels. As conventional phenotypic tests used for the identification of *Staphylococcus* species have limitations (Rossi *et al.* 2001; Morot-Bizot *et al.* 2003), several molecular methods have been developed. Many studies described the use of nucleic acid targets for the molecular identification of *Staphylococcus* species. For instance, Poyart *et al.* (2001) have determined a pair of degenerate primers for amplifying an internal fragment of the *sodA* gene, which can be directly sequenced. This method discriminates most of the *Staphylococcus* species. Kwok and Chow (2003) described the use of the *hsp60* gene for taxonomic and phylogenetic studies for the species of *Staphylococcus* as did Drancourt and Raoult (2002) with the *rpoB* gene. These genes are more discriminatory targets than the 16S rDNA gene (*rrn16S*) for differentiating staphylococcal species, but these methods need to sequence the PCR products, which is time-consuming.

For this reason, genus- and species-specific primers have been developed for the identification of bacteria belonging to the *Staphylococcus* genus (Forsman *et al.* 1997; Martineau *et al.* 2001; Mason *et al.* 2001) and for the species-specific detection of *S. aureus* (Forsman *et al.* 1997; Martineau *et al.* 1998; Marcos *et al.* 1999), *S. epidermidis* (Martineau *et al.* 1996; Forsman *et al.* 1997), *S. saprophyticus* (Martineau *et al.* 2000) and *S. xylosus* (Forsman *et al.* 1997; Aymerich *et al.* 2003; Blaiotta *et al.* 2003b; Morot-Bizot *et al.* 2003). Some studies reported the use of multiplex PCR that associates several primer pairs specific for varied targets in the same amplification reaction. Martineau *et al.* (1998) developed a multiplex PCR, which identifies the *S. aureus* and *S. epidermidis* species. Mason *et al.* (2001) reported a multiplex PCR, which discriminates staphylococci from other genera, distinguishes the *S. aureus* species from the coagulase-negative staphylococci and identifies the oxacillin-resistant staphylococci. Vannuffel *et al.* (1999) proposed a multiplex PCR-reverse hybridization approach targeting the *femA* gene in order to identify clinical staphylococcal species.

In this report, the aim was to develop an accurate multiplex PCR protocol that can identify in the same time

the *Staphylococcus* genus and the main staphylococcal species isolated from food and food environment. This PCR associates five sets of primers specific to the *Staphylococcus* genus (Martineau *et al.* 2001) and to the species *S. epidermidis*, *S. aureus*, *S. saprophyticus* (Martineau *et al.* 1996, 1998, 2000) and *S. xylosus* (Morot-Bizot *et al.* 2003) in the same PCR assay.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and culture conditions

The *Staphylococcus*, *Kocuria*, *Macrococcus* and *Micrococcus* reference strains studied are listed in Table 1. Thirty wild strains of Gram-positive cocci isolated from sausages and environment of workshops manufacturing traditional fermented sausages were grown for 24 h at 30 or 37°C in BHI broth or on BHI agar (Difco, Detroit, MI, USA) and identified by multiplex PCR (Table 2). All isolates were preliminary tested for catalase and oxidase assays and for agglutination by using the Pastorex® Staph-Plus kit (Bio-Rad, France).

DNA preparation

Two millilitres of an overnight culture in BHI broth were used for DNA extraction. Genomic DNA was extracted using the Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega Corp., Madison, WI, USA) according to the manufacturer's instructions.

Quality of the DNA samples

In order to check the quality of the DNA templates, we used a pair of primers (DG74/RW01) corresponding to a region of the 16S rRNA gene conserved in all eubacteria (Greisen *et al.* 1994). An independent PCR was performed with these primers.

Multiplex PCR

Primer design. The primers listed in Table 3 were synthesized by MWG (Ebersberg, Germany). The *S. epidermidis*-specific primers Se705-1, Se705-2, the *S. aureus*-specific primers Sa442-1, Sa442-2, *S. saprophyticus*-specific primers Sap1, Sap2, *Staphylococcus*-specific primers Tstag765 and TstaG422 were designed by Martineau *et al.* (1996, 1998, 2000, 2001). The *S. xylosus*-specific primers XYL F and XYL R were designed in a previous study (Morot-Bizot *et al.* 2003).

Multiplex PCR amplification conditions and detection of the amplified products. PCR amplifications were

Table 1 Reference strains of *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Micrococcus* and *Kocuria* used with the multiplex PCR

Species	Strain	Multiplex PCR products				
		TstaG422/Tstag765	Xyl F/Xyl R	Sap1/Sap2	Sa442-1/Sa442-2	Se705-1/Se705-2
<i>S. arlettae</i>	CIP 103501 T*	+	—	—	—	—
<i>S. aureus</i>	ATCC 25923	+	—	—	+	—
<i>S. aureus</i>	CIP 65.8 T	+	—	—	+	—
<i>S. aureus</i>	CIP 106414	+	—	—	+	—
<i>S. auricularis</i>	DSM 20609 T	+	—	—	—	—
<i>S. capitis</i> subsp. <i>urealyticus</i>	CIP 104192 T	+	—	—	—	—
<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	CIP 81.53 T	+	—	—	—	—
<i>S. caprae</i>	CIP 104000 T	+	—	—	—	—
<i>S. carnosus</i>	DSM 20501 T	+	—	—	—	—
<i>S. cohnii</i>	DSM 20260 T	+	—	—	—	—
<i>S. condimentii</i>	CIP 105760 T	+	—	—	—	—
<i>S. epidermidis</i>	DSM 20044 T	+	—	—	—	+
<i>S. epidermidis</i>	CIP 105777	+	—	—	—	+
<i>S. epidermidis</i>	CIP 68.21	+	—	—	—	+
<i>S. equorum</i>	DSM 20674 T	+	—	—	—	—
<i>S. felis</i>	ATCC 49168 T	+	—	—	—	—
<i>S. gallinarum</i>	CIP 103504 T	+	—	—	—	—
<i>S. haemolyticus</i>	CIP 81. 56 T	+	—	—	—	—
<i>S. hominis</i>	CIP 81.57 T	+	—	—	—	—
<i>S. hyicus</i>	DSM 20459 T	+	—	—	—	—
<i>S. intermedius</i>	CIP 81. 60 T	+	—	—	—	—
<i>S. kloosii</i>	DSM 20676 T	+	—	—	—	—
<i>S. lentus</i>	CIP 81.63 T	+	—	—	—	—
<i>S. lugdunensis</i>	DSM 4804 T	+	—	—	—	—
<i>S. muscae</i>	DSM 7068 T	+	—	—	—	—
<i>S. pasteurii</i>	CIP 103540 T	+	—	—	—	—
<i>S. piscifermentans</i>	CIP 103958 T	+	—	—	—	—
<i>S. putrefaciens</i>	CIP 104364 T	+	—	—	—	—
<i>S. saprophyticus</i>	DSM 76125 T	+	—	+	—	—
<i>S. saprophyticus</i>	CIT 750	+	—	+	—	—
<i>S. saprophyticus</i>	GM 55	+	—	+	—	—
<i>S. schleiferi</i>	DSM 4807 T	+	—	—	—	—
<i>S. sciuri</i>	CIP 81.62 T	+	—	—	—	—
<i>S. simulans</i>	DSM 20322 T	+	—	—	—	—
<i>S. succinus</i>	CIP 107658 T	+	—	—	—	—
<i>S. vitulinus</i>	CIP 104850 T	+	—	—	—	—
<i>S. warneri</i>	DSM 20316 T	+	—	—	—	—
<i>S. xylosus</i>	DSM 20266 T	+	+	—	—	—
<i>S. xylosus</i>	UT C2a	+	+	—	—	—
<i>S. xylosus</i>	CIT M203	+	+	—	—	—
<i>Mac. caseolyticus</i> †	ATCC 13548 T	—	—	—	—	—
<i>M. aurantiacus</i>	ATCC 11731	—	—	—	—	—
<i>K. varians</i>	DSM 20033 T	—	—	—	—	—
<i>K. kristinae</i>	DSM 20032 T	—	—	—	—	—

ATCC, American Type Culture Collection; DSM, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen; CIP, Collection Institut Pasteur; CIT, Collection INRA Theix; GM, Collection INRA Paris-Grignon; UT, University of Tübingen.

*T, type strain.

†Formerly designated *Staphylococcus caseolyticus*.

performed from 3 µl of staphylococcal DNA or from one colony picked up directly from agar plates. The 25 µl-PCR mixture contained 0.5 µM (each) of the primers XYL F/

XYL R, 0.5 µM (each) of the primers Sap1/Sap2, 0.4 µM (each) of the primers Se705-1/Se705-2, 0.4 µM (each) of the primers Sa442-1/Sa442-2, 0.2 µM (each) of the primers

Table 2 Identification by multiplex PCR of the wild strains isolated from traditional fermented sausages and environment of workshops

Strain	Multiplex PCR products				
	TstaG422/ Tstag765	Xyl F/ Xyl R	Sap1/ Sap2	Sa442-1/ Sa442-2	Se705-1/ Se705-2
<i>CIT S00-001</i>	+	–	+	–	–
<i>CIT S00-002</i>	+	–	+	–	–
<i>CIT S00-003</i>	+	–	+	–	–
<i>CIT S00-005</i>	+	–	+	–	–
<i>CIT S00-006</i>	+	–	+	–	–
<i>CIT S00-042</i>	+	–	–	–	–
<i>CIT S00-043</i>	+	–	–	–	–
<i>CIT S00-044</i>	+	–	–	–	–
<i>CIT S00-045</i>	+	–	–	–	–
<i>CIT S00-046</i>	+	–	–	–	–
<i>CIT S00-047</i>	+	–	–	–	–
<i>CIT S00-048</i>	+	–	–	–	–
<i>CIT S00-050</i>	–	–	–	–	–
<i>CIT S00-124</i>	+	–	–	–	+
<i>CIT S00-290</i>	+	+	–	–	–
<i>CIT S00-312</i>	+	+	–	–	–
<i>CIT S00-391</i>	+	–	+	–	–
<i>CIT S00-396</i>	+	–	+	–	–
<i>CIT S00-397</i>	+	–	+	–	–
<i>CIT S00-398</i>	+	–	+	–	–
<i>CIT S00-399</i>	+	–	+	–	–
<i>CIT S00-401</i>	+	–	+	–	–
<i>CIT S00-402</i>	+	–	+	–	–
<i>CIT S00-404</i>	+	–	+	–	–
<i>CIT S00-405</i>	+	–	+	–	–
<i>CIT S00-406</i>	+	–	–	+	–
<i>CIT S00-407</i>	+	–	–	+	–
<i>CIT S00-408</i>	+	+	–	–	–
<i>CIT S00-415</i>	–	–	–	–	–
<i>CIT S00-418</i>	+	+	–	–	–

Table 3 DNA oligonucleotides used as primers in the multiplex polymerase chain reaction

Primers	PCR product (bp)	Sequence (5'–3')
TstaG422	370	GGCCGTGTTGAACGTGGTCAAATCA
Tstag765		TIACCATTTCAGTACCTTCTGGTAA
Xyl F	539	AACGCGCAACGTGATAAAAATTAATG
Xyl R		AACGCGCAACAGCAATTACG
Sap 1	221	TCAAAAAGTTTTCTAAAAAATTTAC
Sap 2		ACGGGCGTCCACAAAATCAATAGGA
Se705-1	124	ATCAAAAAAGTTGGCGAACCTTTTCA
Se705-2		CAAAAGAGCGTGGAGAAAAGTATCA
Sa442-1	108	AATCTTTGTCTCGGTACACGATATTCTTCACG
Sa442-2		CGTAATGAGATTTTCAGTAGATAATACAACA

Tstag765 and TstaG422, 200 μ M of each deoxyribonucleoside triphosphate (Eurobio, France), 3 mM MgCl₂, 10 μ g of bovine serum albumin per reaction and 1 U of *Taq* DNA polymerase in 1X buffer according to the manufacturer's instructions (Promega).

PCR was performed under the following conditions: 15 min at 4°C, 3 min at 94°C, then 40 cycles of 1 s at 95°C, 30 s at 55°C, 30 s at 72°C and a final hold of 3 min at 72°C with a GenAmp® PCR system 9700 PE thermal cycler (Perkin-Elmer, Courtaboeuf, France). Five microlitres of

the PCR reaction mixture were analysed by electrophoresis through a 2% high resolution agarose gel (Invitrogen, France) in 1 X TBE buffer pH 8.3. The sizes of the amplification products were estimated by comparison with a 50-bp molecular size ladder (Promega). Gels were stained with ethidium bromide and digitalized with the Gel Doc 2000 apparatus (Bio-Rad). PCR assays were performed at least three times each to check reproducibility. Each reaction included a control tube without template DNA.

RESULTS

Optimization of the multiplex PCR

To ensure a good amplification with the five primer pairs in the same PCR run, the reaction conditions for the multiplex PCR assays were optimized. The primer pairs were initially used at the same concentration of 0.4 μ M. These conditions resulted in a strong amplification with the Tstag765/TstaG422 primers and in a weak or a lack of amplification with the species-specific primers. To overcome this problem, the concentration of the genus-specific primers was decreased to 0.2 μ M and the concentration of the primers XYL F/XYL R and Sap1/Sap2 was increased to 0.5 μ M. The primers Se705-1/Se705-2 and Sa442-1/Sa442-2 were used at 0.4 μ M. To standardize the conditions of the multiplex protocol, the optimal annealing temperature and MgCl₂ concentration were determined. A range of temperatures between 50 and 60°C and a range of MgCl₂ concentrations between 1.5 and 3.5 mM were tested. It was shown that an annealing temperature of 55°C and 3 mM of MgCl₂ resulted in a strong and reproducible amplification with the five pair of primers.

For all bacterial species, amplifications were performed from purified genomic DNA and from one colony picked up

directly from agar plates. The amplifications were as effective with the picked-up colony as with the purified DNA sample. Therefore, this standardized protocol was used in all the assays with one colony directly picked up from agar plates.

The specificity of the multiplex PCR was assessed with a panel of 34 species and the results of the multiplex PCR amplification are reported in Table 1. The 31 reference strains of *Staphylococcus* were identified to the genus level with the primers TstaG422 and Tstag765 by yielding a 370-bp fragment (Table 1). *Staphylococcus xylosus*, *S. saprophyticus*, *S. epidermidis* and *S. aureus* were identified to the species level by the specific primers XYL F/XYL R, Sap1/Sap2, Se705-1/Se705-2 and Sa442-1/Sa442-2 by yielding specific DNA fragments of sizes 539, 221, 124 and 108 bp, respectively (Fig. 1). All these PCR assays generated no amplification with DNA other than that of the target species.

The quality of the DNA samples that gave negative multiplex PCR results was checked by running PCR assays with the eubacterial primers DG74/RW01. All DNA samples gave an expected band of 370 bp, indicating that the lack of amplification with the genus- and species-specific primers from organisms other than the targeted bacteria reflected the specificity of the multiplex PCR protocol than the lack of suitable template DNA (data not shown).

Application of the multiplex PCR for the identification of strains isolated from sausages and environment of workshops manufacturing traditional fermented sausages

All the 30 wild strains of Gram-positive cocci were catalase positive and oxidase negative. Only two strains, *CIT S00-*

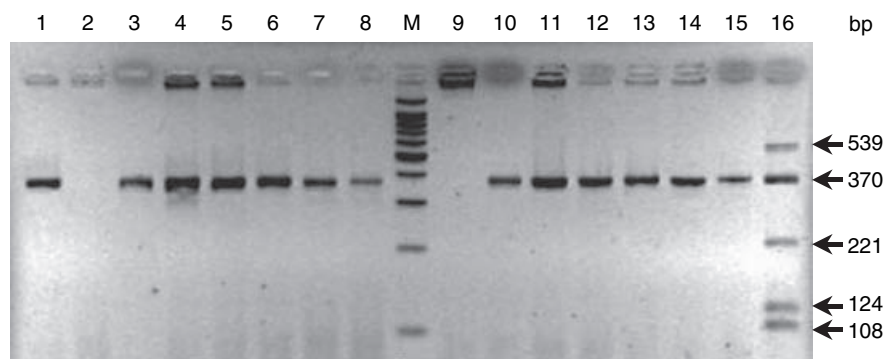


Fig. 1 Multiplex PCR amplifications obtained with *Staphylococcus*-, *S. xylosus*-, *S. saprophyticus*-, *S. epidermidis*- and *S. aureus*-specific primers. Lane M, 50-bp molecular size DNA ladder (Promega); lane 1, *S. caprae* CIP 104000 T; lane 2, *K. kristinae* DSM 20032 T; lane 3, *S. carnosus* DSM 20501 T; lane 4, *S. condimentii* CIP 105760 T; lane 5, *S. felis* ATCC 49168 T; lane 6, *S. gallinarum* CIP 103504 T; lane 7, *S. hominis* CIP 81-57 T; lane 8, *S. kloosii* DSM 20676 T; lane 9, *Mac. caseolyticus* ATCC 13548 T; lane 10, *S. piscifermentans* CIP 103958 T; lane 11, *S. schleiferi* DSM 4807 T; lane 12, *S. sciuri* CIP 81-62 T; lane 13, *S. auricularis* DSM 20609 T; lane 14, *S. warneri* DSM 20316 T; lane 15, *S. succinus*; lane 16, *S. xylosus* DSM 20266 T, *S. saprophyticus* DSM 76125 T, *S. epidermidis* DSM 20044 T, *S. aureus* ATCC 25923

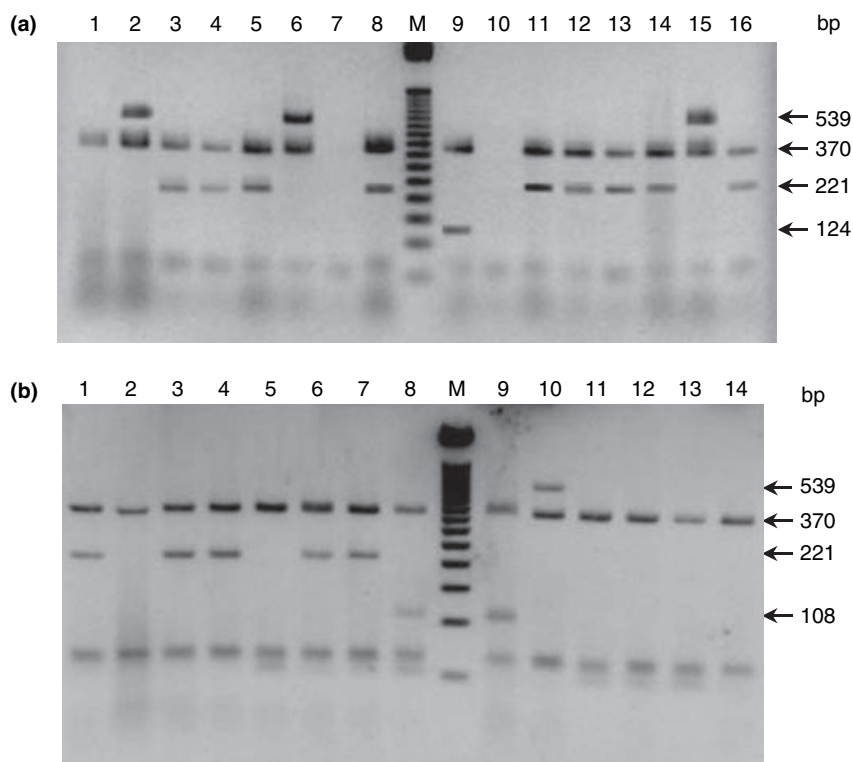


Fig. 2 Multiplex PCR amplicons obtained with the wild strains of Gram-positive cocci isolated from traditional fermented sausages and environment of workshops. (a) Lane M: 50-bp-molecular-size DNA ladder (Promega); lane 1, *S00-042*; lane 2, *S00-290*; lane 3, *S00-001*; lane 4, *S00-002*; lane 5, *S00-003*; lane 6, *S00-312*; lane 7, *S00-050*; lane 8, *S00-005*; lane 9, *S00-124*; lane 10, *S00-415*; lane 11, *S00-006*; lane 12, *S00-391*; lane 13, *S00-396*; lane 14, *S00-397*; lane 15, *S00-408*; lane 16, *S00-398*. (b) Lane M, 50-bp-molecular-size DNA ladder (Promega); lane 1, *S00-399*; lane 2, *S00-043*; lane 3, *S00-401*; lane 4, *S00-402*; lane 5, *S00-044*; lane 6, *S00-404*; lane 7, *S00-405*; lane 8, *S00-406*; lane 9, *S00-407*; lane 10, *S00-418*; lane 11, *S00-045*; lane 12, *S00-046*; lane 13, *S00-047*; lane 14, *S00-048*.

406 and *CIT S00-407*, gave an agglutination with the test reagent of the Pastorex[®] Staph-Plus kit. Then, one colony of each of the wild strains picked up from BHI agar plates after 24 h of culture was subjected to the multiplex PCR. Twenty-eight strains gave a PCR product of 370 bp, confirming that they belong to the *Staphylococcus* genus and two did not give any fragment, showing that they belong to another genus of Gram-positive cocci (Fig. 2). Through these 28 strains, 14 of them were identified to *S. saprophyticus* by producing a PCR product of 221 bp. Four strains were identified to *S. xyloso* by giving a PCR product of 539 bp, two strains gave an amplification with the *S. aureus* specific-primers by producing an expected band of 108 bp and one gave a PCR product of 124 bp with the *S. epidermidis*-specific primers. Seven *Staphylococcus* strains could not be identified at the species level because they did not give any amplification with the four pairs of specific primers.

DISCUSSION

Staphylococci are commonly present in clinical and food environments. Because of their ubiquitous spreading, the bacteria belonging to this genus are increasingly studied. In particular, phenotypic and genotypic identifications of strains isolated from fermented sausages pointed up four staphylococcal species: *S. xyloso* and *S. saprophyticus*, which

seemed to be the most isolated species and the food-borne pathogens *S. epidermidis* and *S. aureus*, which can be occasionally isolated from these products. Thus, the accurate and rapid identification of these four species became necessary.

To identify the main staphylococcal species in foodstuff, PCR is the method of choice for rapid and reliable identification, the biochemical tests being unable to unequivocally distinguish the staphylococcal species. Until now, most of the PCR identifications of the staphylococcal species isolated from food products were performed with one or two primer pairs, targeting only one or two species at the same time. Knowing that food products can have a complex bacterial flora, single PCR becomes time consuming in the case of an ecological study. Thus, the multiplex PCR, which combines two or more primer pairs in the same reaction, have been developed. Ramesh *et al.* (2002) reported the use of the multiplex PCR for identification of *S. aureus* and *Yersinia enterocolitica* in milk samples, but to our knowledge, no study used this approach for the identification of staphylococcal strains isolated from fermented sausages or environment of workshops.

In order to identify the four species, which have a relevant interest for the food manufacturing plants, we performed a multiplex PCR that associates five pair of primers amplifying fragments specific for the *Staphylococcus* genus (Martineau *et al.* 2001) and for the species *S. xyloso* (Morot-Bizot

et al. 2003), *S. epidermidis*, *S. aureus* and *S. saprophyticus* (Martineau *et al.* 1996, 1998, 2000). These primers were selected on their thermodynamical compatibility and on the production of PCR bands electrophoretically distinct in size. Despite the fact that Martineau *et al.* (2001) observed a weak amplification with *Macrococcus caseolyticus*, no amplification with the *Staphylococcus*-specific primers was observed in our conditions from the *Mac. caseolyticus* strain, the *Micrococcus aurantiacus* strain and the two *Kocuria* species tested. Ah Tow and Cowan (2003) have reported in a comment that the *Staphylococcus* generic primers developed by Martineau *et al.* (2001) also amplify the *tuf* genes of the genera *Planococcus* and *Planomicrobium*, showing that these primers have to be used with caution. However, these two genera have been isolated from a variety of marine environments and some Antarctic lakes, which constitute particular niches, and they have never been isolated from foodstuff and food environment.

In this study, the evaluation of this multiplex PCR protocol with reference strains belonging to different species showed that assays are very specific. The identification of the 30 strains isolated from sausages and environment of workshops manufacturing traditional fermented sausages showed a predominance of the *S. saprophyticus* species. This is in agreement with results of other studies (Samelis *et al.* 1998; Papamanoli *et al.* 2002; Mauriello *et al.* 2004).

In conclusion, this multiplex PCR protocol, performed directly on a single colony and by targeting the *Staphylococcus* genus and four species in the same reaction mixture, makes the analysis of isolates much easier. Compared with standard bacteriological assays, the multiplex PCR assays are more accurate and more rapid to perform. They reduce the identification time from 3 days for phenotypic tests to <1 day. Moreover, this multiplex PCR offers the opportunity of an accurate identification of bacteria belonging to the *Staphylococcus* genus and the *S. xylosus*, *S. saprophyticus*, *S. epidermidis* and *S. aureus* species isolated from food products and environment of food manufacturing plants. The validation of this method for a direct analysis on sausages and food environment samples is in progress.

ACKNOWLEDGEMENT

This work was financially supported by EU programme QLK1-CT2002-02240.

REFERENCES

- Ah Tow, L. and Cowan, D.A. (2003) Non-specificity of *Staphylococcus* generic primers. *Microbiology* **149**, 1605–1607.
- Aymerich, T., Martin, B., Garriga, M. and Hugas, M. (2003) Microbial quality and direct PCR identification of lactic acid bacteria and nonpathogenic staphylococci from artisanal low-acid sausages. *Applied and Environmental Microbiology* **69**, 4583–4594.
- Blaiotta, G., Pennacchia, C., Ercolini, D., Moschetti, G. and Villani, F. (2003a) Combining denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA V3 region and 16S–23S rDNA spacer region polymorphism analyses for the identification of staphylococci from Italian fermented sausages. *Systematic and Applied Microbiology* **26**, 423–433.
- Blaiotta, G., Pennacchia, C., Parente, E. and Villani, F. (2003b) Design and evaluation of specific PCR primers for rapid and reliable identification of *Staphylococcus xylosus* strains isolated from dry fermented sausages. *Systematic and Applied Microbiology* **26**, 601–610.
- Cáceres, P., Castillo, D. and Pizarro, M. (1997) Secondary flora of Casar de Cáceres cheese: characterization of *Micrococcaceae*. *International Dairy Journal* **7**, 531–536.
- Deinhofer, M. and Pernthaler, A. (1995) *Staphylococcus* spp. as mastitis-related pathogens in goat milk. *Veterinary Microbiology* **43**, 161–166.
- Di Maria, S., Basso, A.L., Santoro, E., Grazia, L. and Coppola, R. (2002) Monitoring of *Staphylococcus xylosus* DSM 20266 added as starter during fermentation and ripening of soppressata molisana, a typical Italian sausage. *Journal of Applied Microbiology* **92**, 158–164.
- Drancourt, M. and Raoult, D. (2002) *rpoB* gene sequence-based identification of *Staphylococcus* species. *Journal of Clinical Microbiology* **40**, 1333–1338.
- Forsman, P., Tilsala-Timisjärvi, A. and Alattosava, T. (1997) Identification of staphylococcal and streptococcal causes of bovine mastitis using 16S–23S rRNA spacer regions. *Microbiology* **143**, 3491–3500.
- Greisen, K., Loeffelholz, M., Purohit, A. and Leong, D. (1994) PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid. *Journal of Clinical Microbiology* **32**, 335–351.
- Kloos, W.E. and Schleifer, K.H. (1986) Genus IV. *Staphylococcus*. Rosenbach 1884. In *Bergey's manual of Systematic Bacteriology*. vol. 2. ed. Holt, J.G., Sneath, P.H.A., Mair, N.S. and Sharpe, M.S. pp. 1013–1035. Baltimore, MD: Williams and Wilkins.
- Kwok, A.Y.C. and Chow, A.W. (2003) Phylogenetic study of *Staphylococcus* and *Macrococcus* species based on partial hsp60 gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **53**, 87–92.
- Marcos, J.Y., Soriano, A.C., Salazar, M.S., Moral, C.H., Ramos, S.S., Smeltzer, M.S. and Carrasco, G.N. (1999) Rapid identification and typing of *Staphylococcus aureus* by PCR–restriction fragment length polymorphism analysis of the *aroA* gene. *Journal of Clinical Microbiology* **37**, 570–574.
- Martineau, F., Picard, F., Roy, P., Ouellette, M. and Bergeron, M. (1996) Species-specific and ubiquitous DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Clinical Microbiology* **34**, 2888–2893.
- Martineau, F., Picard, F.J., Roy, P.H., Ouellette, M. and Bergeron, M.G. (1998) Species-specific and ubiquitous-DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology* **36**, 618–623.
- Martineau, F., Picard, F.J., Menard, C., Roy, P.H., Ouellette, M. and Bergeron, M.G. (2000) Development of a rapid PCR assay specific

- for *Staphylococcus saprophyticus* and application to direct detection from urine samples. *Journal of Clinical Microbiology* **38**, 3280–3284.
- Martineau, F., Picard, F.J., Ke, D., Paradis, S., Roy, P.H., Ouellette, M. and Bergeron, M.G. (2001) Development of a PCR assay for identification of staphylococci at genus and species levels. *Journal of Clinical Microbiology* **39**, 2541–2547.
- Mason, W.J., Blevins, J.S., Beenken, K., Wibowo, N., Ojha, N. and Smeltzer, M.S. (2001) Multiplex PCR protocol for the diagnosis of staphylococcal infection. *Journal of Clinical Microbiology* **39**, 3332–3338.
- Mauriello, G., Casaburi, A., Blaiotta, G. and Villani, F. (2004) Isolation and technological properties of coagulase negative staphylococci from fermented sausages of Southern Italy. *Meat Science* **67**, 149–158.
- Morot-Bizot, S., Talon, R. and Leroy-Setrin, S. (2003) Development of specific PCR primers for a rapid and accurate identification of *Staphylococcus xylosus*, a species used in food fermentation. *Journal of Microbiological Methods* **55**, 279–286.
- Papamanoli, E., Kotzekidou, P., Tzanetakis, N. and Litopoulou-Tzanetaki, E. (2002) Characterization of *Micrococcaceae* isolated from dry fermented sausage. *Food Microbiology* **19**, 441–449.
- Poyart, C., Quesne, G., Boumaila, C. and Trieu-Cuot, P. (2001) Rapid and accurate species-level identification of coagulase-negative staphylococci by using the *sodA* gene as a target. *Journal of Clinical Microbiology* **39**, 4296–4301.
- Ramesh, A., Padmapriya, B.P., Chrashekar, A. and Varadaraj, M.C. (2002) Application of a convenient DNA extraction method and multiplex PCR for the direct detection of *Staphylococcus aureus* and *Yersinia enterocolitica* in milk samples. *Molecular and Cellular Probes* **16**, 307–314.
- Rodriguez, M., Nunez, F., Cordoba, J., Bermudez, E. and Asensio, M. (1996) Gram-positive, catalase-positive cocci from dry cured Iberian ham and their enterotoxigenic potential. *Applied and Environmental Microbiology* **62**, 1897–1902.
- Rossi, F., Tofalo, R., Torriani, S. and Suzzi, G. (2001) Identification by 16S–23S rDNA intergenic region amplification, genotypic and phenotypic clustering of *Staphylococcus xylosus* strains from dry sausages. *Journal of Applied Microbiology* **90**, 365–371.
- Samelis, J., Metaxopoulos, J., Vlassi, M. and Pappa, A. (1998) Stability and safety of traditional Greek salami – a microbiological ecology study. *International Journal of Food Microbiology* **44**, 69–82.
- Vannuffel, P., Heusterspreute, M., Bouyer, M., Vandercam, B., Philippe, M. and Gala, J.-L. (1999) Molecular characterization of *femA* from *Staphylococcus hominis* and *Staphylococcus saprophyticus*, and *femA*-based discrimination of staphylococcal species. *Research in Microbiology* **150**, 129–141.
- Vilar, I., Garcia Fontan, M.C., Prieto, B., Tornadijo, M.E. and Carballo, J. (2000) A survey on the microbiological changes during the manufacture of dry-cured lacón, a Spanish traditional meat product. *Journal of Applied Microbiology* **89**, 1018–1026.

PARTIE 2

**Etude de la flore staphylococcale isolée de
l'environnement et des produits d'ateliers producteurs de
salaisons**

(ARTICLES 3 et 4)

La production française de saucissons secs se distingue par deux types de production. L'une traditionnelle est caractérisée par le fait que les saucissons sont fermentés naturellement, c'est-à-dire qu'il n'y a pas de ferments sélectionnés ajoutés à la mûlée. L'autre artisanale ou industrielle selon la capacité de production de l'atelier, est caractérisée par l'ensemencement de la mûlée avec des ferments sélectionnés qui permettent le contrôle de la fermentation des saucissons.

La fermentation naturelle repose essentiellement sur la flore microbienne indigène dont la composition est variable et dont la croissance dépend des conditions environnementales. L'origine de cette flore peut être variée et reste assez mal connue. Elle peut provenir des matières premières contaminées lors de l'abattage et/ou des manipulations successives. Elle peut également provenir de l'environnement des ateliers de fabrication. Les staphylocoques à coagulase négative qui appartiennent au groupe des coques à Gram positif et catalase positive (CGC⁺) font partie de cette flore indigène et peuvent participer au processus de fermentation.

Les saucissons artisanaux ou industriels sont ensemencés avec des ferments composés au minimum par un mélange d'une bactérie lactique et d'un staphylocoque à coagulase négative. A notre connaissance, il n'y a pas dans la littérature de données concernant l'implantation des SCN dans les produits et la colonisation éventuelle de l'environnement par ces SCN.

C'est dans ce contexte que nous nous sommes fixés pour objectif de faire l'inventaire des espèces de SCN présentes aussi bien au niveau des matières premières et des produits aux différents stades de fabrication, qu'au niveau de l'environnement d'ateliers producteurs de saucissons secs de type traditionnel, artisanal et industriel. Ces études ont fait l'objet de deux publications (articles 3 et 4).

Article n°3

Stéphanie Corbière Morot-Bizot, Sabine Leroy, Régine Talon

**Staphylococcal community of a small unit manufacturing traditional
dry fermented sausages**

International Journal of Food Microbiology (2006)

1 - PROBLEMATIQUE

La flore staphylococcale indigène qui colonise l'environnement des ateliers producteurs de salaisons traditionnelles peut jouer un rôle potentiel dans la contamination de la matière première ou des produits. Afin de déterminer l'incidence de cette flore, les SCN isolés des matières premières, des saucissons à différents stades de fabrication, des équipements et des surfaces d'un atelier traditionnel n'utilisant aucun ferment, ont été identifiés. Pour prendre mieux en compte la diversité de cette flore, quatre prélèvements indépendants de matière et de surface ont été effectués à deux saisons différentes, au printemps et en hiver.

L'atelier de fabrication sélectionné pour cette étude est situé dans une ferme de moyenne montagne en Haute Loire. Les saucissons sont fabriqués sans ajout de ferment, de nitrate ou de nitrite et sont séchés en séchoir naturel.

Pour répondre à cette problématique, les coques à Gram positif et catalase positive (CGC⁺) ont été dénombrés au niveau des prélèvements de matière et de surface. Les isolats ont été identifiés par la PCR multiplex ciblant le genre *Staphylococcus* et les espèces *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus* et *S. xylosus*. Les staphylocoques non identifiés au niveau de l'espèce ont été caractérisés par leur pulsotype. Une analyse phylogénétique comparant les profils obtenus avec ceux de souches de référence de différentes espèces de staphylocoque a été ensuite réalisée afin d'aider à l'identification. Une souche représentative de chaque pulsotype a été identifiée au niveau de l'espèce par séquençage d'un fragment interne du gène *sodA*.

2 - RESULTATS

Dénombrement et répartition des CGC⁺ dans l'atelier traditionnel et dans les produits

- Tous les échantillons environnementaux étaient colonisés par des CGC⁺, à des taux compris entre 2.10^2 et 1.10^7 UFC/100 cm², indépendamment de la période du prélèvement.
- Les surfaces les plus colonisées étaient celles du séchoir, de la chambre froide, des tables et du billot.
- Les niveaux de contamination des matières premières et des saucissons étaient plus élevés au printemps qu'en hiver. Au niveau des saucissons en fin de fabrication, la population des CGC⁺ atteignait un taux de 2.10^8 UFC/g au printemps et de 2.10^6 UFC/g en hiver.

Identification des isolats par PCR multiplex genre-espèces

- Sur 436 isolats (149 et 287 collectés, respectivement, en hiver et au printemps) identifiés par PCR multiplex, 412 appartenaient au genre *Staphylococcus*, 24 à l'espèce *S. saprophyticus* et 22 à l'espèce *S. xylosus*. Ainsi, 366 souches de staphylocoques restaient à identifier au niveau de l'espèce.

Détermination du pulsotype des souches de staphylocoques, analyse phylogénétique et identification des souches par séquençage d'un fragment interne du gène *sodA*

- La caractérisation des 366 souches de SCN par PFGE après restriction enzymatique avec l'enzyme *SmaI* a révélé 17 profils distincts (A à Q).
- Les pulsotypes les plus fréquemment retrouvés étaient le C (21%) et le N (32%).
- L'analyse phylogénétique a montré un taux de similarité très bas entre 15 des 17 pulsotypes et les pulsotypes de 16 souches de référence appartenant à différentes espèces. Le pulsotype N était lié à plus de 60% à l'espèce *S. succinus* et le pulsotype I montrait 100% d'identité avec la souche de référence *S. carnosus*.
- Le séquençage partiel du gène *sodA* d'une souche représentative de chacun des 17 pulsotypes a permis de déterminer que les souches appartenant aux pulsotypes A à H étaient des *S. equorum*, celles des pulsotypes J et K des *S. simulans*, celles des pulsotypes L à M des *S. succinus* et celles des pulsotypes O à Q des *S. warneri*. Cela a également permis de confirmer que les souches du pulsotypes N appartenaient bien à l'espèce *S. succinus* et celles du pulsotype I à l'espèce *S. carnosus*.
- Les espèces *S. equorum* et *S. succinus* représentaient 82% des souches isolées. Une grande diversité de profils au sein de l'espèce *S. equorum* a été mise en évidence puisque 8 pulsotypes distincts étaient observés, dont un majoritaire, le pulsotype C, représentant 38% des souches. A contrario, une faible diversité était observée parmi les souches de *S. succinus* car parmi les trois pulsotypes, le N était très majoritaire représentant 86% des souches.

Distribution des espèces et pulsotypes dans les matières premières, les saucissons et l'environnement

- Sept espèces différentes de SCN, *S. equorum*, *S. succinus*, *S. saprophyticus*, *S. xylosus*, *S. carnosus*, *S. simulans* et *S. warneri*, ont été isolées au printemps et 5 en hiver. En effet, les espèces *S. xylosus* et *S. carnosus* n'ont été identifiées qu'au printemps.

- Douze pulsotypes correspondant aux espèces *S. equorum*, *S. succinus* et *S. simulans* ont été isolés quelle que soit la saison.
- En hiver, les souches de *S. equorum* de pulsotype C étaient prédominantes et relativement ubiquitaires puisqu'elles étaient retrouvées sur les surfaces et les équipements mais également au niveau des produits.
- Au printemps, les souches de *S. succinus* de pulsotype N et les souches de *S. equorum* de pulsotype C étaient majoritairement isolées de tous les prélèvements aussi bien de surface que de matière.
- Aucune corrélation n'a pu être établie entre les pulsotypes et l'origine de prélèvement des souches.

Staphylococcal community of a small unit manufacturing traditional dry fermented sausages

Stéphanie Corbière Morot-Bizot, Sabine Leroy, Régine Talon *

INRA, Unité Microbiologie, Centre de Recherche Clermont-Ferrand Theix, 63122 Saint-Genès Champanelle, France

Received 3 August 2005; received in revised form 18 November 2005; accepted 2 December 2005

Abstract

The level and the diversity of the staphylococcal community occurring in the environment and meat products of a small unit manufacturing traditional dry fermented sausages were investigated at two seasons: winter and spring. Gram-positive cocci were enumerated and a collection of 412 *Staphylococcus* isolates was made. Multiplex PCR, pulse-field gel electrophoresis (PFGE) and sequencing of the *sodA* gene were used to identify and characterize the isolates. High counts of *Staphylococcus* were found in final traditional sausages, reaching about 6 log CFU/g in winter and about 8 log CFU/g in spring. In the environment, the counts varied from 2 log to 7 log/100 cm², the higher colonisation being observed on the surface of the drying and cold rooms, cutting tables and the butcher's block. The combination of the three methods allowed the identification of seven species of *Staphylococcus* in spring and five in winter. *S. equorum* and *S. succinus* dominated both in environment and in meat products, 49% and 33% of the isolates, respectively. The other identified species were in decreasing order *S. saprophyticus* (6%), *S. xylosus* (5%), *S. carnosus* (5%), *S. simulans* (1%) and *S. warneri* (1%). The two species *S. xylosus* and *S. carnosus* were sporadically isolated during the spring. PFGE allowed the assignment of *S. equorum* to eight pulsotypes showing a wide diversity among this species. But the entire environment and the meat products were dominated by one pulsotype. For *S. succinus*, three pulsotypes were found with one dominant mainly isolated during the spring sampling. This study highlighted the diversity of staphylococci isolated in the environment and the meat products of a small processing unit manufacturing traditional dry fermented sausages. The *S. equorum* and *S. succinus* species rarely described in meat products and never in the environment had great capacity to colonise the entire small processing unit and the meat products.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: *Staphylococcus*; Diversity; Sausages; Environment

1. Introduction

Traditional dry sausages are essentially made with pork lean and fat that are mixed with salt, spices and are processed without the addition of starter cultures. The fermentation of these products only relies on the indigenous microbial flora whose composition is variable and the growth promoted by the environmental conditions (Cocolin et al., 2001a; Rebecchi et al., 1998). This indigenous flora is composed by a wide variety of micro-organisms derived from raw materials contaminated during slaughter. This flora could colonize the batter, the products or the environment of the small processing units (Larrouture et al., 2000; Talon et al., 2003).

The micro-organisms of technological interest isolated from the indigenous flora of naturally fermented sausages generally belong to the Lactic Acid Bacteria (LAB) group and to the Gram-positive Catalase-positive Cocci (GCC⁺) group mainly represented by the *Staphylococcus* and *Kocuria* genera. The LAB ensure the stability of the products mainly by producing lactic acid, which prevents the growth of pathogens. The GCC⁺ are involved in color development thanks to the nitrate reductase activity and enhance the sensory properties of fermented sausages mainly through the amino and fatty acid degradations (Talon et al., 1999, 2002).

Among the GCC⁺, many staphylococcal species have been isolated from dry fermented sausages. The *Staphylococcus xylosus* and *S. saprophyticus* species were found dominant in Greek fermented sausages (Samelis et al., 1998; Papamanoli et al., 2002; Drosinos et al., 2005). In Spanish sausages, *S. xylosus* was the dominant species (Garcia-Varona et al., 2000) whereas

* Corresponding author. Tel.: +33 4 73 62 41 70; fax: +33 4 73 62 42 68.
E-mail address: talon@clermont.inra.fr (R. Talon).

in low-acid chorizos the staphylococcal flora was more diversified, dominated by *S. xylosus*, *S. carnosus* and *S. epidermidis* (Aymerich et al., 2003). In Italian sausages, the indigenous flora was composed of *S. xylosus*, *S. saprophyticus* and *S. equorum* but many other species have been identified such as *S. succinus*, *S. warneri*, *S. vitulinus*, *S. pasteurii*, *S. epidermidis*, *S. lentus* and *S. haemolyticus* (Coppola et al., 2000; Cocolin et al., 2001a; Rossi et al., 2001). In traditional French dry fermented sausages, the main species identified were *S. xylosus*, *S. carnosus*, *S. warneri* and *S. saprophyticus* (Montel et al., 1992, 1996).

The identification of staphylococci to the species level by phenotypical methods has limitations and may have resulted in misidentifications (Rhoden and Miller, 1995; Blaiotta et al., 2003). In order to provide increasingly reliable identifications, several molecular methods have been developed, including PCR-based methods such as randomly amplified polymorphic DNA-PCR analysis (Rossi et al., 2001), species-specific PCR (Aymerich et al., 2003; Morot-Bizot et al., 2003), multiplex PCR (Corbière Morot-Bizot et al., 2004), partial sequencing of the highly conserved *tuf*, *sodA* or *hsp60* genes for the identification of species of the genus *Staphylococcus* (Martineau et al., 2001; Poyart et al., 2001; Kwok and Chow, 2003), and oligonucleotide array targeting *sodA* gene (Giammarinaro et al., 2005). Many typing methods have also been used to characterize staphylococci, such as pulse-field gel electrophoresis (PFGE) (Snopkova et al., 1994), ribotyping (Villard et al., 2000), denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of 16S rRNA gene fragments (Cocolin et al., 2001b) and amplification of the 16S-23S intergenic spacer region (ISR) (Rossi et al., 2001; Blaiotta et al., 2003).

Most of the studies on the staphylococcal species isolated from dry fermented sausages focused on the flora of the meat products and its evolution along the process. The *Staphylococcus* house-flora occurring in the environment of processing unit manufacturing naturally fermented sausages has been poorly studied although the environmental flora could contribute to the contamination of the meat products. In this study, we aimed to characterize by molecular methods the staphylococcal flora of a traditional small processing unit through the study of the raw materials, the sausages and the environment. The GCC⁺ isolates were subjected to a multiplex PCR identifying the ones belonging to the *Staphylococcus* genus and to the *S. xylosus*, *S. saprophyticus*, *S. epidermidis* and *S. aureus* species. Staphylococci, which did not belong to the former species, were typed and grouped by the PFGE technique. Then, each PFGE group was identified to species level thanks to the partial sequencing of the *sodA* gene. Two species *S. equorum* and *S. succinus* were found to mainly colonize the meat products and environment of this small processing unit.

2. Materials and methods

2.1. Staphylococcal reference species

Strains belonging to the *Staphylococcus* species described in dry naturally fermented sausages flora were used in this study as

reference (Table 1). They were grown at 30 or 37 °C on Brain Heart Infusion (BHI) broth or agar (Difco, Detroit, USA).

2.2. Sampling procedures and isolation of strains

A collection of GCC⁺ strains was obtained by sampling a small unit manufacturing naturally fermented sausages during two seasons, winter and spring. This unit is located in a medium mountain area in France. Dry sausages were manufactured with pork lean (2/3), pork fat (1/3), NaCl (2.5%), spices (mainly pepper) and without use of starter cultures and nitrate or nitrite. The batter was stuffed into natural casings and ripening was performed as follows: one week of fermentation with a relative humidity (RH) of 76% to 88% at 12 °C and eight weeks of drying with 76% to 86% RH in a natural drying room. The average ambient temperature in the drying room varied to 9.5 °C in winter to 13.5 °C in spring. In the processing room, the average ambient temperature varied to 12.5 °C in winter to 16.5 °C in spring. After processing, the unit was cleaned and decontaminated with a solution of quaternary ammonium at 1% (v/v), pH 9 (Bactégil, Sodevi, Saint Etienne, France). The decontaminating solution was applied 5 min and rinsed.

Samples were collected at 14 control points during winter and spring samplings. Ten surface samples (1 from carcass, 3 from machines, 2 from tools, 4 from environment) were collected by swabbing a surface of 100 cm² (Tables 2 and 3). Surfaces and equipments were sampled prior to processing and after cleaning and disinfection. Four samples were collected from the meat products (raw material, batter, sausage after one week of fermentation and sausage after nine weeks). GCC⁺ were enumerated by spread plating in Chapman agar (Merck, Darmstadt, Germany) at 30 °C for two days. For each sampling point, 3 to 40 colonies on plates of Chapman agar were randomly selected, plated on BHI agar. The strains were screened by Gram staining and catalase test and stored at –80 °C in BHI broth containing 20% glycerol before being subjected to molecular analysis.

Table 1
Staphylococcal species encountered in dry fermented sausages used as reference

Species or subspecies	Strain
<i>S. aureus</i>	CIP 65.8 T ^a
<i>S. carnosus</i>	DSM 20501 T ^b
<i>S. cohnii</i>	DSM 20260 T
<i>S. epidermidis</i>	DSM 20044 T
<i>S. equorum</i> subsp. <i>equorum</i>	DSM 20674 T
<i>S. equorum</i> subsp. <i>linens</i>	CIP 107656 T
<i>S. haemolyticus</i>	CIP 81.56 T
<i>S. intermedius</i>	CIP 81.60 T
<i>S. kloosii</i>	DSM 20676 T
<i>S. lentus</i>	CIP 81.63 T
<i>S. pasteurii</i>	CIP 103540 T
<i>S. saprophyticus</i>	CIP 76.125 T
<i>S. simulans</i>	DSM 20322 T
<i>S. succinus</i>	CIP 107307 T
<i>S. vitulinus</i>	CIP 104850 T
<i>S. warneri</i>	DSM 20316 T
<i>S. xylosus</i>	DSM 20266 T

^a CIP, Collection Institut Pasteur.

^b DSM, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen.

Table 2

Distribution of pulsotypes and identification of the staphylococcal species among the small processing unit during winter sampling

PFGE group	Surfaces and equipment									Meat samples				Total	<i>sodA_{int}</i> identification (% identity)
	Cold room	Wall	Tables	Block	Knives	Mincing machine	Stuffing machine	Drying room	Carcass	Fat/lean	Batter	Sausage, 1 week	Sausage, 9 weeks		
A			2	3	1			1		1		1	2	11	<i>S. equorum</i> (100%)
B	2	1	2	1				1			2	3	2	14	<i>S. equorum</i> (100%)
C	2				1	1	7	9	1	3		3	3	30	<i>S. equorum</i> (98%)
D		1	4		1			2	3			1		12	<i>S. equorum</i> (98%)
E	2		1	2	1			5		1		2	2	16	<i>S. equorum</i> (99%)
F	2		1											3	<i>S. equorum</i> (98%)
G								3		1		1		5	<i>S. equorum</i> (98%)
H			1	1	4			2		2				10	<i>S. equorum</i> (99%)
J			1											1	<i>S. simulans</i> (97%)
L	1		2	1										4	<i>S. succinus</i> (99%)
M							2							2	<i>S. succinus</i> (100%)
N	1		1				2	2		1		1	3	11	<i>S. succinus</i> (100%)
P													1	1	<i>S. warneri</i> (100%)
															PCR identification
			4			2	4							10	<i>S. saprophyticus</i>
Total	10	2	19	8	8	3	15	25	4	9	2	12	13	130	

A total of 436 GCC⁺ were isolated, 149 and 287 strains from the winter and spring samplings, respectively.

2.3. PCR multiplex protocol

The 436 GCC⁺ isolates grown on BHI agar medium for 24 h at 30 °C were submitted to multiplex PCR. Amplifications were performed from one colony of each isolate with the primers TstaG422, Tstag765, Se705-1, Se705-2, Sa442-1, Sa442-2, XYL F, XYL R, Sap1 and Sap2 allowing the identification of the *Staphylococcus* genus and of the *S. epidermidis*, *S. aureus*, *S. xylosus* and *S. saprophyticus* species, respectively, as previously described (Corbière Morot-Bizot et al., 2004).

2.4. Typing of the isolates by PFGE

The 366 *Staphylococcus* spp. isolates unidentified by the multiplex PCR and the reference strains were submitted to PFGE analysis. Agarose plugs containing chromosomal DNA were prepared, digested with the endonuclease *Sma*I (Promega, Lyon Charbonnières, France) according to the manufacturer's instructions and separated by PFGE in a contour-clamped homogeneous electric field apparatus CHEF-DRIII (Bio-Rad, Ivry, France) as previously reported (Morot-Bizot et al., 2003). The pulse-field program was defined as follows: (i) pulse times of 10 to 30 s, 6 V/cm, with a running time of 23 h, and (ii) pulse times of 50 to 100 s, 6 V/cm, with a running time of 1 h. Lambda ladder (Promega) was used as molecular weight marker. Gels were stained with ethidium bromide and digitalized with the Gel Doc 2000 apparatus (Bio-Rad). Analysis of *Sma*I macrorestriction profiles and phylogenetic analyses were performed with Diversity Database software (Bio-Rad). Isolates with a DNA band pattern differing by more than three band shifts were interpreted as being genetically unrelated and of different pulsotype (Tenover et al., 1995). The pulsotypes were assigned a distinct capital letter. Cluster analyses using the Dice correlation

for band matching with a 2% position tolerance and a hierarchic unweighted pair group method (UPGMA) were used to generate a dendrogram.

2.5. DNA sequence analysis of the *sodA_{int}* gene

The internal fragment of *sodA* gene (*sodA_{int}*) from a representative strain of each pulsotype was amplified by the d1 and d2 primers as reported by Poyart et al. (2001). The PCR products were purified with the QIAquick PCR purification kit (QIAGEN, Hilden, Germany) and both strands were directly sequenced with the d1 and d2 oligonucleotides by using the 'BigDye terminator cycle sequencing ready reaction' kit with an automatic DNA sequencer 'ABI PRISM 310' (Perkin-Elmer). The sequences were aligned with those in GenBank with the BLAST program to determine the closest known relatives of the *sodA_{int}* sequence obtained (Altschul et al., 1990).

2.6. Accession numbers

The GenBank accession numbers of the partial *sodA* sequences of *Staphylococcus* isolates belonging to pulsotypes A to Q are AY818174, AY821519, AY818175, AY818176, AY818177, AY818178, AY818179, AY818180, AY795886, AY795887, AY795888, AY795892, AY795893, AY795894, AY795889, AY795890 and AY795891, respectively.

3. Results

3.1. GCC⁺ counts

The counts and distribution of GCC⁺ are shown in Fig. 1. All the environmental samples were colonized by the GCC⁺ flora with counts ranging between 2×10^2 and 1×10^7 CFU/100 cm². The GCC⁺ counts did not differ (<1 log CFU/100 cm²) between the winter and spring samplings but the tables, which were more

contaminated in spring. The most colonized environmental samples were the surfaces of drying room and the butcher's block. The counts of GCC^+ in the raw materials (fat and lean) were similar in winter and spring samplings (Fig. 1). However, the level of GCC^+ was higher in the batter in spring compared to the winter samples (3×10^5 versus 1×10^2 CFU/g). Then, in both sampling periods, during the first week of fermentation the GCC^+ flora quite rapidly increased to 7×10^7 and 2×10^5 CFU/g in spring and winter, respectively. During the eight following weeks of process the GCC^+ continued to grow slowly. At the end of ripening the counts of GCC^+ were 2 log CFU/g higher in spring than in winter (2×10^8 versus 2×10^6 CFU/g).

3.2. Identification of *Staphylococcus* isolates by PCR

The 149 and 287 GCC^+ strains collected during the winter and spring samplings, respectively, and isolated from the environment and meat samples of the small processing unit were analyzed by multiplex PCR. Among the 436 isolates, 412 gave a PCR product of 370 bp, confirming that they belonged to the *Staphylococcus* genus and 24 did not give any fragment, showing that they belonged to another genus of Gram-positive cocci (data not shown). These 24 isolates were not further categorized. Among the 412 *Staphylococcus* isolates, 24 were identified as *S. saprophyticus* by producing a specific PCR product of 221 bp (data not shown). Ten *S. saprophyticus* isolates were recovered from the winter sampling (Table 2). They were only isolated from environment samples. From spring sampling, 14 other *S. saprophyticus* isolates were recovered from the environment and meat samples (Table 3). Twenty two isolates were identified as *S. xylosus* by giving a specific PCR product of 539 bp (data not shown). All of the *S. xylosus* isolates were recovered from the spring sampling

(Table 3). Fourteen isolates were recovered from the environment. From the meat samples, 8 isolates were found but only in the batter. *S. aureus* and *S. epidermidis* were never isolated from any location.

3.3. *Staphylococcal* pulsotypes and cluster analysis

The 366 *Staphylococcus* isolates unidentified by multiplex PCR (120 and 246 from winter and spring samplings, respectively) were characterized by PFGE after *Sma*I restriction of DNA. They were divided into 17 distinct PFGE patterns named pulsotypes and designated A to Q (Fig. 2). The dominant pulsotypes were C and N, recovering 21% (77 of 366) and 32% (117 of 366) of the staphylococcal isolates, respectively. Each of the remaining pulsotypes represented less than 10% of the isolates. In order to evaluate the relatedness between each of the pulsotypes determined, a cluster analysis was performed and a phylogenetic tree was constructed (Fig. 3). The pulsotypes of the reference strains belonging to the most frequently staphylococcal species encountered in fermented sausages (Table 1, Fig. 2) were included in the analysis. The analysis of pulsotypes revealed that the different groups of isolates and the reference strains were poorly clustered with less than 40% relatedness among the pulsotypes. The low similarity observed between the different pulsotypes is in accordance with the results obtained by Snopkova et al. (1994) showing the wide diversity of PFGE patterns among the staphylococcal species. Only two pulsotypes among the 17 were closely related to reference strains, such as the pulsotype N, which was related to the *S. succinus* reference strain showing a similarity of 63% and the pulsotype I, which was 100% identical to pulsotype of the *S. carnosus* reference strain.

Table 3
Distribution of pulsotypes and identification of the staphylococcal species among the small processing unit during spring sampling

PFGE group	Surfaces and equipment											Meat samples				Total	<i>sodA</i> _{int} identification (% identity)
	Cold room	Wall	Tables	Block	Knives	Bowls	Mincing machine	Mixing machine	Stuffing machine	Drying room	Carcass	Fat/lean	Batter	Sausage, 1 week	Sausage, 9 weeks		
A				1			3	2			1		1	3	2	13	<i>S. equorum</i> (100%)
B			1	1			2	4		2				2	3	15	<i>S. equorum</i> (100%)
C	4	1	10	2	3	5	1	1		5		1		2	12	47	<i>S. equorum</i> (98%)
D					1	1				4		1		1		8	<i>S. equorum</i> (98%)
E	2		4				1	1		2		1		2		13	<i>S. equorum</i> (99%)
F			1													1	<i>S. equorum</i> (98%)
G	1		1													2	<i>S. equorum</i> (98%)
H															1	1	<i>S. equorum</i> (99%)
I						1				18						19	<i>S. carnosus</i> (99%)
J				1							1		1			3	<i>S. simulans</i> (97%)
K													1			1	<i>S. simulans</i> (98%)
L	11								1							12	<i>S. succinus</i> (99%)
M												1				1	<i>S. succinus</i> (100%)
N	6	1	13	4	4	7	9	11	11	5	3	13	9	9	1	106	<i>S. succinus</i> (100%)
O				1									1	1		3	<i>S. warneri</i> (99%)
Q														1		1	<i>S. warneri</i> (97%)
			1		2			1		4		2	3		1	14	PCR identification
	3		1			1		3		6			8			22	<i>S. saprophyticus</i>
Total	27	2	32	10	10	15	16	23	12	46	5	19	24	21	20	282	<i>S. xylosus</i>

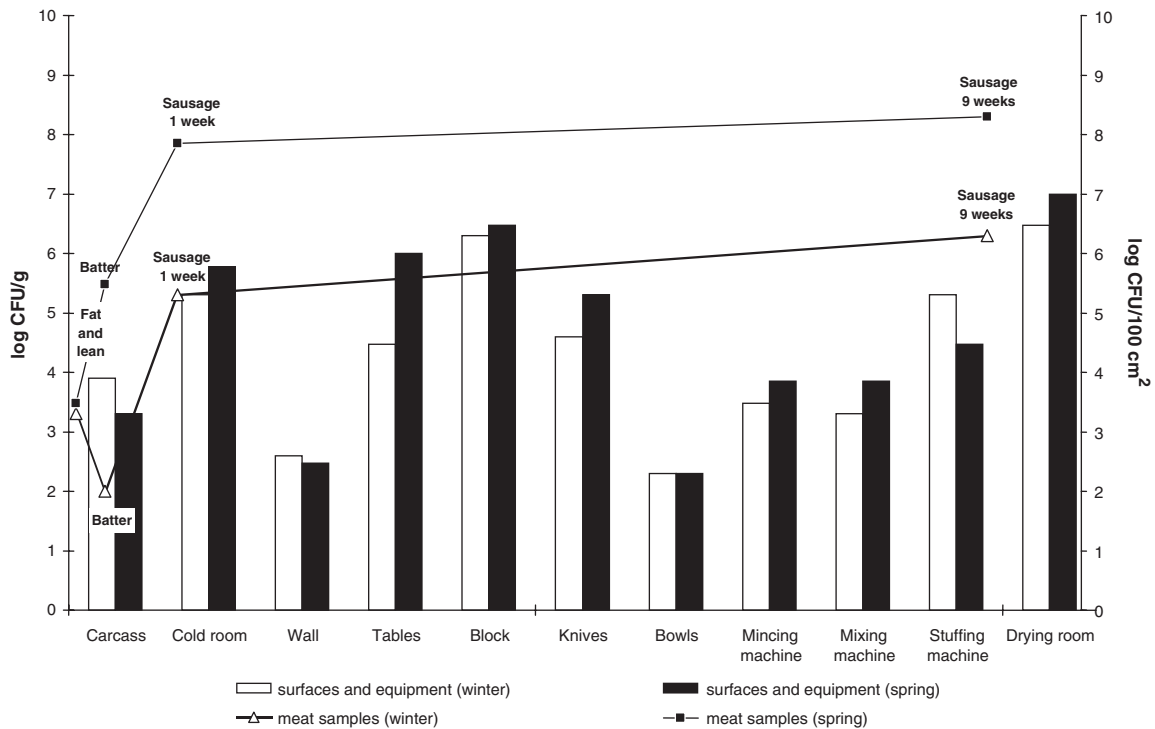


Fig. 1. *GCC*⁺ counts from samples taken throughout the environment and the meat products of the small processing unit.

3.4. Identification of *Staphylococcus* isolates by *sodA*_{int} sequencing

In order to identify at the species level the strains belonging to the different pulsotypes, the *sodA*_{int} gene sequences of one

representative strain per pulsotype were determined. The comparisons of sequences were done using BLAST (Altschul et al., 1990). The strains belonging to the pulsotypes A to H were identified as *S. equorum*, the *sodA*_{int} sequences of representative strains showing identity values of 100% to 98% (Tables 2 and 3).

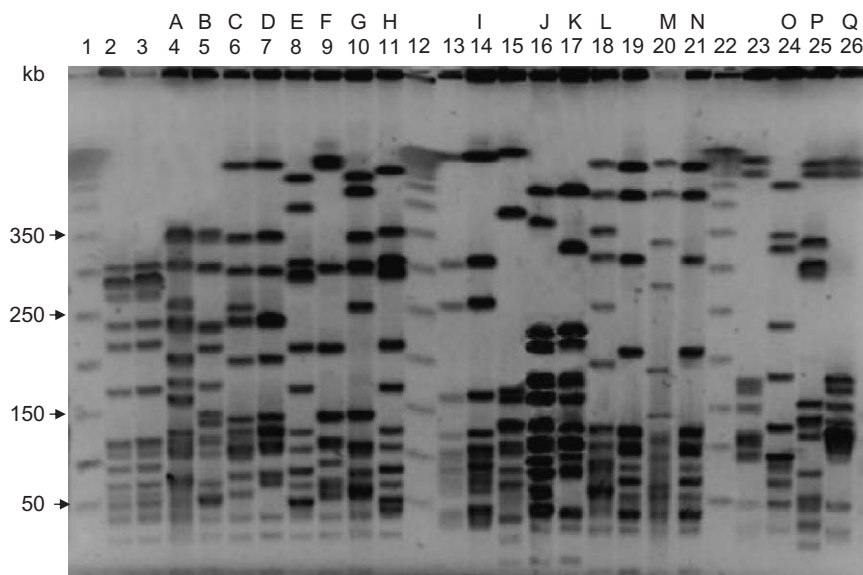


Fig. 2. PFGE profiles of *Sma*I restricted genomic DNA of the *Staphylococcus* isolates and reference strains. Lanes 1, 12 and 22: Lambda ladder (Promega); lane 2: *S. equorum* subsp. *lineus* CIP 107656 T; lane 3: *S. equorum* subsp. *equorum* DSM 20674 T; lane 4: CIT S00-004 (pulsotype A); lane 5: CIT S00-034 (B); lane 6: CIT S00-175 (C); lane 7: CIT S00-422 (D); lane 8: CIT S00-024 (E); lane 9: CIT S00-130 (F); lane 10: CIT S00-092 (G); lane 11: CIT S00-023 (H); lane 13: *S. carnosus* DSM 20501 T; lane 14: CIT S00-298 (I); lane 15: *S. simulans* DSM 20322 T; lane 16: CIT S00-420 (J); lane 17: CIT S00-437 (K); lane 18: CIT S00-032 (L); lane 19: *S. succinus* CIP 107307 T; lane 20: CIT S00-161 (M); lane 21: CIT S00-182 (N); lane 23: *S. warneri* DSM 20316 T; lane 24: CIT S00-147 (O); lane 25: CIT S00-237 (P); lane 26: CIT S00-438 (Q).

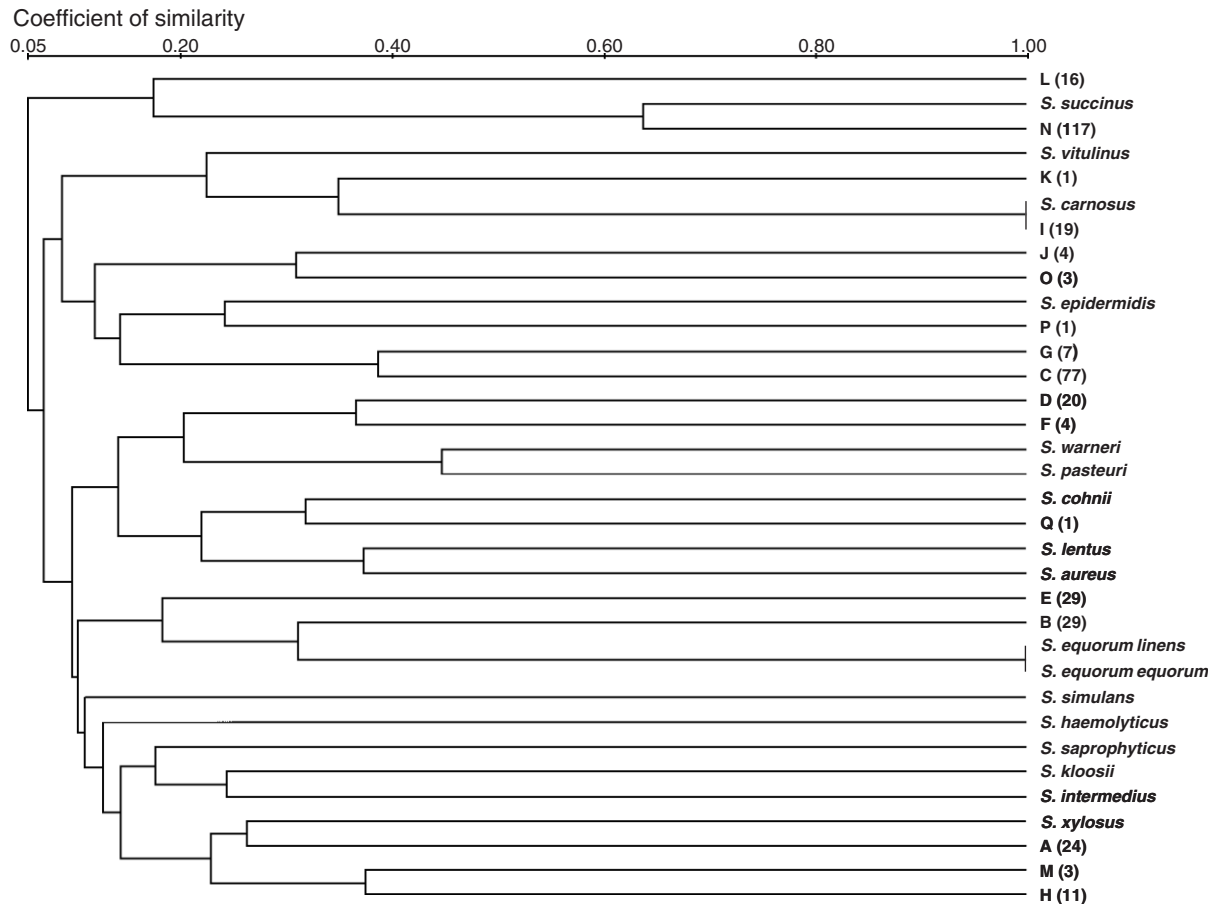


Fig. 3. Relatedness of the staphylococcal pulsotypes analyzed with the Dice similarity coefficient and the UPGMA method. The dendrogram was constructed with 2% band tolerance. The letters A to Q indicate the pulsotypes and the figures in brackets represent the number of isolates found in each pulsotype.

The representative strain of the pulsotype I which was identical to the pulsotype of the *S. carnosus* reference strain was confirmed to belong to the *S. carnosus* species, the *sodA_{int}* sequence showing identity value of 99%. The strains of pulsotypes J and K were identified as *S. simulans*, the *sodA_{int}* sequences of the two representative strains showing identity values of 98% to 97%. The strains belonging to the pulsotypes L to N were identified to *S. succinus*, the *sodA_{int}* sequences of representative strains showing identity values of 100% to 99%. The strains of pulsotypes O and Q were identified to *S. warneri*, the *sodA_{int}* sequences of the representative strains showing identity values of 100% to 97%.

3.5. Distribution of the staphylococcal pulsotypes in the environment and the meat products

The distribution of the pulsotypes of the staphylococcal isolates recovered from samples is shown in the Tables 2 and 3. Twelve of the pulsotypes (A to H, J, L, M, N) were found independently of the period of sampling, whereas the pulsotype P was sporadic in winter and the pulsotypes I, K, O and Q were sporadic in spring. From the winter sampling, the isolates displayed 13 different pulsotypes. All of the winter sampling points were colonized by staphylococci except the bowls and the mixing machine. The pulsotype C was predominant in winter

representing 25% of the isolates (30 of 120). This pulsotype was relatively ubiquitous and colonized surfaces, equipment and meat products. The B and E pulsotypes represented 12% and 13% of the isolates, respectively, and were found in most samples. From the spring sampling, the isolates displayed 16 different pulsotypes. All of the sampling points were colonized by staphylococci. The pulsotype N was dominant with 43% of the spring isolates (106 of 246). The pulsotype C was the second one with 19% of the isolates showing this pattern (47 of 246). These two pulsotypes were relatively ubiquitous because they were found from almost all sampling points. The pulsotypes F, G, I and L only colonized the environment whereas the H, M and Q pulsotypes were only found in the meat samples. No correlation could be established between the pulsotypes and the origin of sample.

4. Discussion

In this study, the diversity of the staphylococcal community of a small unit manufacturing traditional dry fermented sausages was evaluated by the identification and characterization of 412 *Staphylococcus* strains isolated from the meat products and the environment. Counts of GCC⁺ colonies dominated by staphylococci (94%) ranged from 1×10^2 to 3×10^5 CFU/g in the batter to 2×10^6 to 2×10^8 CFU/g in the sausages at the end of ripening.

The level of GCG⁺ in the final product was comparable with the level observed in the artisanal low-acid sausages (fuets and chorizos), which ranged from 2×10^5 to 1×10^8 CFU/g (Aymerich et al., 2003). In the environment counts of GCC⁺ colonies ranged from 2×10^2 to 1×10^7 CFU/100 cm². The density of colonization was relatively high in the entire small processing unit which offered conditions suitable for the survival of the staphylococci. The most colonized samples of environment were the surfaces of drying and cold rooms, the butcher's block and the cutting tables. To our knowledge, the evaluation of the GCG⁺ colonization of the environment of food plants manufacturing dry sausages had not been studied previously.

The *Staphylococcus* isolates were identified by using multiplex PCR, PFGE patterns and determination of the *sodA*_{int} gene sequences. The combination of these methods allowed the identification of seven *Staphylococcus* species and showed that the staphylococcal flora of the environment and meat products of this small processing unit was dominated by the *S. equorum* and *S. succinus* species, 49% and 33% of the isolates, respectively. These two species dominated over the other staphylococci species, namely *S. saprophyticus*, *S. xylosus*, *S. carnosus*, *S. simulans* and *S. warneri*. During the winter sampling, only five species among the seven were found: *S. equorum*, *S. succinus*, *S. saprophyticus*, *S. simulans* and *S. warneri*. The season had an effect on the ambient temperature of the processing unit. The higher temperature in the unit in spring (>4 °C) could explain the different repartition of the staphylococci species during the two seasons.

The dominant *S. equorum* and *S. succinus* species were ubiquitous and isolated in the environment and in the meat products. These species have been already described in the flora of fermented sausages. Blaiotta et al. (2004) have studied the diversity of staphylococci from naturally fermented sausages and found that about 10% of the strains belonged to *S. equorum* and less than 2% to *S. succinus* species (Blaiotta et al., 2004). In other Italian traditional fermented sausages, Mauriello et al. (2004) found that *S. equorum* was one of the most common species and could represent up to 40% of the staphylococcal flora. The *S. equorum* species was not yet often described in fermented sausages but was frequently described in other foods such as cured hams and cheeses (Blaiotta et al., 2004). Moreover, some authors agreed with the fact that this species can be misidentified because of the difficulty of separating this species from *S. xylosus*, mostly when the identification is based on phenotypic methods (Blaiotta et al., 2004; Mauriello et al., 2004). The 201 strains of *S. equorum* isolated in this study belonged to eight distinct unrelated pulsotypes (A to H) showing a wide diversity among this species. However the dominant pulsotype C with 77 clones was found in the environment of the small processing unit and in the meat products. The presence of a dominant pulsotype indicates that some strains may be capable for adaptation to food plant environment and processing and for survival in the small processing unit. The presence of eight other pulsotypes suggests a continuous source for colonization of this small processing unit. One hundred and thirty six strains of *S. succinus* were also isolated in this study. The *S. succinus* species has been rarely described in food. It was found at low levels in the smear cheese flora (Place et al., 2002) in

Italian fermented sausages (Blaiotta et al., 2003, 2004) and in fresh sausages (Rantsiou et al., 2005). The strains isolated belonged to three pulsotypes but one was mainly dominant with 86% of strains. These strains were largely isolated during the spring sampling suggesting a better colonization or survival when the outside temperature increased.

The 75 remaining isolates were identified as *S. saprophyticus* (24 strains), *S. xylosus* (22), *S. carnosus* (19), *S. simulans* (5) and *S. warneri* (5). The *S. saprophyticus* species has been already described in other studies, essentially in Greek fermented sausages in which this species was found dominant (Samelis et al., 1998; Papamanoli et al., 2002; Drosinos et al., 2005). The *S. warneri* and *S. simulans* species have also sporadically been isolated from Italian traditional fermented sausages (Blaiotta et al., 2004; Mauriello et al., 2004). The two technologically important species, *S. xylosus* and *S. carnosus*, occurred at a relatively low percentage (<10%) of the isolates and were sporadically isolated during the spring sampling. In many studies, *S. xylosus* was the predominant species of staphylococci isolated from naturally fermented sausages (Blaiotta et al., 2004; Mauriello et al., 2004; Drosinos et al., 2005). Surprisingly, in this study, *S. xylosus* was not frequently isolated. But more surprisingly, the *S. xylosus* and *S. carnosus* strains were never isolated in the final products even though some strains of *S. xylosus* were isolated in the batter before the fermentation.

In conclusion, the study of a small unit manufacturing naturally fermented sausages showed that there is a variety of staphylococci found in meat and food plant environment with seven species identified. The analysis of the staphylococcal flora at two seasons pointed out differences in the diversity of species through the seasons, because more species were found in spring than in winter. It revealed the occurrence of two species, *S. equorum* and *S. succinus*, which are rarely described in the meat products and never in the environment. These species showed a high capacity to colonize the surfaces, the equipment and the meat products. A further study should be done in other small processing units manufacturing traditional dry fermented sausages to determine the prevalence of these two species in such environments.

Acknowledgements

This work is part of a FNADT program (1999/3). We are grateful to Jean-Paul Chacornac, Sébastien Maseglia and Brigitte Duclos for technical assistance. The authors would like to thank Jean Labadie for a critical and careful review of the manuscript. S. Corbière Morot-Bizot is the recipient of a fellowship of the French Ministry of "Education Nationale et Recherche".

References

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215 (3), 403–410.
- Aymerich, T., Martin, B., Garriga, M., Hugas, M., 2003. Microbial quality and direct PCR identification of lactic acid bacteria and nonpathogenic staphylococci from artisanal low-acid sausages. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 4583–4594.

- Blaiotta, G., Pennacchia, C., Ercolini, D., Moschetti, G., Villani, F., 2003. Combining denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA V3 region and 16S-23S rDNA spacer region polymorphism analyses for the identification of staphylococci from Italian fermented sausages. *Systematic and Applied Microbiology* 26, 423–433.
- Blaiotta, G., Pennacchia, C., Villani, F., Ricciardi, A., Tofalo, R., Parente, E., 2004. Diversity and dynamics of communities of coagulase-negative staphylococci in traditional fermented sausages. *Journal of Applied Microbiology* 97, 271–284.
- Cocolin, L., Manzano, M., Cantoni, C., Comi, G., 2001a. Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the 16s rRNA gene V1 region to monitor dynamic changes in the bacterial population during fermentation of Italian sausages. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 5113–5121.
- Cocolin, L., Manzano, M., Aggio, D., Cantoni, C., Comi, G., 2001b. A novel polymerase chain reaction (PCR) — denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) for the identification of Micrococcaceae strains involved in meat fermentations. Its application to naturally fermented Italian sausages. *Meat Science* 58, 59–64.
- Coppola, S., Mauriello, G., Aponte, M., Moschetti, G., Villani, F., 2000. Microbial succession during ripening of Naples-type salami, a southern Italian fermented sausage. *Meat Science* 56, 321–329.
- Corbière Morot-Bizot, S., Talon, R., Leroy, S., 2004. Development of a multiplex PCR for the identification of *Staphylococcus* genus and four staphylococcal species isolated from food. *Journal of Applied Microbiology* 97, 1087–1094.
- Drosinos, E.H., Mataragas, M., Xiraphi, N., Moschonas, G., Gaitis, F., Metaxopoulos, J., 2005. Characterization of the microbial flora from a traditional Greek fermented sausage. *Meat Science* 69, 307–317.
- García-Varona, M., Santos, E.M., Jaime, I., Rovira, J., 2000. Characterisation of Micrococcaceae isolated from different varieties of chorizo. *International Journal of Food Microbiology* 54, 189–195.
- Giammarinaro, P., Leroy, S., Chacornac, J.P., Delmas, J., Talon, R., 2005. Development of a new oligonucleotide array to identify staphylococcal strains at species level. *Journal of Clinical Microbiology* 43, 3673–3680.
- Kwok, A.Y.C., Chow, A.W., 2003. Phylogenetic study of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species based on partial *hsp60* gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53, 87–92.
- Larrouture, C., Ardaillon, V., Pepin, M., Montel, M.C., 2000. Ability of meat starter cultures to catabolize leucine and evaluation of the degradation products by using an HPLC method. *Food Microbiology* 17, 563–570.
- Martineau, F., Picard, F.J., Ke, D., Paradis, S., Roy, P.H., Ouellette, M., Bergeron, M.G., 2001. Development of a PCR assay for identification of staphylococci at genus and species levels. *Journal of Clinical Microbiology* 39, 2541–2547.
- Mauriello, G., Casaburi, A., Blaiotta, G., Villani, F., 2004. Isolation and technological properties of coagulase negative staphylococci from fermented sausages of southern Italy. *Meat Science* 67, 149–158.
- Montel, M.C., Talon, R., Cantonnet, M., Fournaud, J., 1992. Identification of *Staphylococcus* from French dry sausage. *Letters in Applied Microbiology* 15, 73–77.
- Montel, M.C., Reitz, J., Talon, R., Berdague, J.L., Rousset-Akrim, S., 1996. Biochemical activities of Micrococcaceae and their effects on the aromatic profiles and odours of a dry sausage model. *Food Microbiology* 13, 489–499.
- Morot-Bizot, S., Talon, R., Leroy-Sétrin, S., 2003. Development of specific PCR primers for a rapid and accurate identification of *Staphylococcus xylosus*, a species used in food fermentation. *Journal of Microbiological Methods* 55, 279–286.
- Papamanoli, E., Kotzekidou, P., Tzanetakis, N., Litopoulou-Tzanetaki, E., 2002. Characterization of Micrococcaceae isolated from dry fermented sausage. *Food Microbiology* 19, 441–449.
- Place, R.B., Hiestand, D., Burri, S., Teuber, M., 2002. *Staphylococcus succinus* subsp. casei subsp. nov., a dominant isolate from a surface ripened cheese. *Systematic Applied Microbiology* 25, 353–359.
- Poyart, C., Quesne, G., Boumaila, C., Trieu-Cuot, P., 2001. Rapid and accurate species-level identification of coagulase-negative staphylococci by using the *sodA* gene as a target. *Journal of Clinical Microbiology* 39, 4296–4301.
- Rantsiou, K., Iacumin, L., Cantoni, C., Comi, G., Cocolin, L., 2005. Ecology and characterization by molecular methods of *Staphylococcus* species isolated from fresh sausages. *International Journal of Food Microbiology* 97, 277–284.
- Rebecchi, A., Crivori, S., Sarra, P.G., Cocconcelli, P.S., 1998. Physiological and molecular techniques for the study of bacterial community development in sausage fermentation. *Journal of Applied Microbiology* 84, 1043–1049.
- Rhoden, D.L., Miller, J.M., 1995. Four-year prospective study of STAPH-IDENT system and conventional method for reference identification of *Staphylococcus*, *Stomatococcus*, and *Micrococcus* spp. *Journal of Clinical Microbiology* 33 (1), 96–98.
- Rossi, F., Tofalo, R., Torriani, S., Suzzi, G., 2001. Identification by 16S-23S rDNA intergenic region amplification, genotypic and phenotypic clustering of *Staphylococcus xylosus* strains from dry sausages. *Journal of Applied Microbiology* 90, 365–371.
- Samelis, J., Metaxopoulos, J., Vlassi, M., Pappa, A., 1998. Stability and safety of traditional Greek salami — a microbiological ecology study. *International Journal of Food Microbiology* 44, 69–82.
- Snopkova, S., Götz, F., Doskar, J., Rosypal, S., 1994. Pulse-field gel electrophoresis of the genomic restriction fragments of coagulase-negative staphylococci. *FEMS Microbiology Letters* 124, 131–140.
- Talon, R., Walter, D., Chartier, S., Barriere, C., Montel, M.C., 1999. Effect of nitrate and incubation conditions on the production of catalase and nitrate reductase by staphylococci. *International Journal of Food Microbiology* 52, 47–56.
- Talon, R., Leroy-Sétrin, S., Fadda, S., 2002. Bacterial starters involved in the quality of fermented meat products. In: Toldrá, F. (Ed.), *Research Advances in Quality of Meat and Meat Products*. Research Signpost, Trivandrum, India, pp. 175–191.
- Talon, R., Leroy-Sétrin, S., Fadda, S., 2003. Dry fermented sausages. In: Hui, Y.H., et al. (Ed.), *Handbook of Food and Beverage Fermentation Technology*. Marcel Dekker Inc., New York, pp. 397–416.
- Tenover, F., Arbeit, R., Goering, R., Mickelsen, P., Murray, B., Persing, D., Swaminathan, B., 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis, criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology* 33, 2233–2239.
- Villard, L., Kodjo, A., Borges, E., Maurin, F., Richard, Y., 2000. Ribotyping and rapid identification of *Staphylococcus xylosus* by 16-23S spacer amplification. *FEMS Microbiology Letters* 185, 83–87.

Article n°4

Stéphanie Corbière Morot-Bizot, Sabine Leroy, Régine Talon

**Monitoring of staphylococcal starters in two French processing plants
manufacturing dry fermented sausages**

Journal of Applied Microbiology (avril 2006)

1 - PROBLEMATIQUE

La fermentation des saucissons artisanaux ou industriels est assurée par l'ajout de ferments, tels que *S. carnosus* et *S. xylosus*, qui sont sélectionnés pour leur incidence sur les qualités organoleptiques des produits. Ces deux espèces contribuent au développement et à la stabilité de la couleur rouge caractéristique des salaisons via leur activité nitrate réductase et participent à la formation des arômes en agissant sur la formation de composés volatils odorants.

S. carnosus et *S. xylosus* sont les deux seules espèces de SCN utilisées comme ferments de salaison. Elles sontensemencées dans les mûlées ensemble ou séparément et toujours en association avec une bactérie lactique. Il est important lorsque l'on développe des ferments de connaître leur compétitivité par rapport à des souches sauvages présentes dans la mûlée. Cependant, il n'y avait pas dans la littérature de données concernant la croissance et la survie de ces deux espèces lors du procédé de fabrication de saucissons français. De plus, la colonisation éventuelle de l'environnement des ateliers producteurs utilisant ces deux espèces comme ferment était totalement méconnue.

Notre objectif a été de suivre l'implantation de ferments commercialisés, *S. carnosus* et *S. xylosus*, tout au long de la fabrication de saucissons secs dans un atelier artisanal et dans un atelier industriel et d'étudier la colonisation de l'environnement des deux ateliers.

Pour répondre à cet objectif, les coques à Gram positif et catalase positive (CGC⁺) ont été dénombrés dans cinq échantillons de l'environnement, trois de saucissons à différents stades et deux de boyaux pour les deux ateliers. L'atelier artisanal produit environ 900 kg par an de saucissons secs et l'industriel 5000 tonnes par an. Les isolats de CGC⁺ ont été identifiés d'abord par PCR spécifique du genre, puis par hybridation avec des sondes oligonucléotidiques spécifiques des espèces. Les isolats identifiés à *S. carnosus* et *S. xylosus* et les souches de ferments ont été typés par PFGE.

2 - RESULTATS

Dénombrement des CGC⁺ dans les ateliers et les produits

- Les échantillons de l'environnement des deux ateliers étaient très faiblement colonisés par les CGC⁺, de l'ordre de 10² UFC/100 cm².

- La croissance des CGC⁺ était différente dans les deux fabrications bien que les mêlées soientensemencées à un même taux. Dans la fabrication artisanale, les CGC⁺ se sont multipliés pendant tout le procédé alors que dans la fabrication industrielle, ils se sont développés pendant la phase d'étuvage. Mais dans les deux fabrications, la population maximale atteinte était très proche.

Identification des isolats

- L'analyse par PCR a montré que 81% (164/202) des isolats de l'atelier artisanal et 72% (172/238) des isolats de l'atelier industriel appartenaient au genre *Staphylococcus*.
- Parmi les souches de *Staphylococcus*, l'hybridation avec les sondes oligonucléotidiques a révélé que 90% des souches de l'atelier artisanal et 77% des souches de l'atelier industriel appartenaient à l'espèce *S. xylosus*, tandis que 10% des souches de l'atelier artisanal et 20% des souches de l'atelier industriel étaient identifiées à *S. carnosus*.
- Les mêlées des deux fabrications étaientensemencées par les deux espèces dans un ratio proche, à savoir 57% de *S. xylosus* et 43% de *S. carnosus* dans l'atelier artisanal et 53% de *S. xylosus* et 47% de *S. carnosus* dans l'atelier industriel. Dès l'étape de fermentation, l'espèce *S. xylosus* devenait dominante dans les deux fabrications, de l'ordre de 90%.
- *S. carnosus* survivait pendant tout le procédé et représentait moins de 10% des isolats en fin de fabrication.
- La caractérisation par PFGE des souches du ferment a révélé deux pulsotypes pour *S. xylosus* suggérant la présence de deux souches et un seul pour *S. carnosus*.
- Tous les isolats identifiés à *S. xylosus* présentaient uniquement les profils des deux souches du ferment. Les deux souches co-donnaient dans la production industrielle alors qu'une des souches dominait dans le procédé artisanal.
- Tous les isolats identifiés à *S. carnosus* présentaient uniquement le profil de la souche du ferment.
- Aucune souche de ferment n'a été isolée dans l'environnement des deux ateliers qui est majoritairement colonisé par les espèces *S. equorum* et *S. saprophyticus*.
- Cette étude a révélé que ce ferment composé des deux espèces de *Staphylococcus* s'implantait dans les deux types de fabrication.

ORIGINAL ARTICLE

Monitoring of staphylococcal starters in two French processing plants manufacturing dry fermented sausages

S. Corbiere Morot-Bizot, S. Leroy and R. Talon

INRA, Unité Microbiologie, Centre de Recherche Clermont-Ferrand-Theix, Saint-Genès Champanelle, France

Keywords

oligonucleotide array, PFGE, PCR, *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus carnosus*, starter cultures.

Correspondence

R. Talon, INRA, Unité Microbiologie, Centre de Recherche Clermont-Ferrand-Theix, 63122 Saint-Genès Champanelle, France.
E-mail: talon@clermont.inra.fr

2005/1242: received 19 October 2005, revised 30 January 2006 and accepted 1 April 2006

doi:10.1111/j.1365-2672.2006.03041.x

Abstract

Aims: The growth and survival of *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus carnosus* were monitored during sausage manufacture in two processing plants.

Methods and Results: The gram-positive, catalase-positive cocci isolated from the processing plants F10 and F11 were identified by *Staphylococcus*-specific PCR and species-specific oligonucleotide array. In the inoculated products with starter cultures, 90% of staphylococcal strains isolated in F10 were identified as *S. xylosus* and 10% as *S. carnosus*. In F11, 77% were identified as *S. xylosus* and 20% as *S. carnosus*. *Staphylococcus xylosus* dominated the staphylococcal microbiota while *S. carnosus* survived during the process. The pulse-field gel electrophoresis analysis revealed that all *S. xylosus* and *S. carnosus* strains isolated corresponded to the starter strains inoculated. The two starter strains of *S. xylosus* co-dominated in the isolates from sausages of F11, whereas the strain with pattern A1 was dominant in the isolates from sausages of F10. In the environments, no *S. carnosus* and *S. xylosus* were found, whereas *Staphylococcus equorum* and *Staphylococcus saprophyticus* were the main species isolated.

Conclusions: This work highlighted the domination of *S. xylosus* starter strains, which showed a strong capacity to grow during sausage process, while *S. carnosus* survived during the process.

Significance and Impact of the Study: Successful implantation of starter cultures is obviously a prerequisite for their contribution to sensorial qualities. Thus, the monitoring of the growth and the survival of *S. xylosus* and *S. carnosus* are required to guarantee a well-adapted starter culture. This study revealed that the two *Staphylococcus* species are suitable for manufacturing sausages in processing plants with very different capacities of production.

Introduction

Most dry-fermented sausages are produced with starter cultures, generally consisting of a combination of lactic acid bacteria (LAB), *Lactobacillus curvatus* or *Lactobacillus sakei*, and *Staphylococcus carnosus* and/or *Staphylococcus xylosus* (Rebecchi *et al.* 1998; Rossi *et al.* 2001). Starters have been developed to insure safety, to contribute to colour and flavour as well as to extend the shelf life of products (Rebecchi *et al.* 1998; Papamanoli *et al.* 2002).

Staphylococcus carnosus and *S. xylosus*, thanks to their nitrate reductase activity, contribute to the development

of the colour of dry fermented sausages (Talon *et al.* 1999). They also contribute to the typical aroma of dry sausages by modulating the level and the nature of volatile compounds arising from lipid oxidation and amino acid catabolism (Talon *et al.* 2002). Via their antioxidant enzymes, superoxide dismutase and catalase, they reduce rancidity (Barrière *et al.* 2001). *Staphylococcus carnosus* was shown to be able to produce methyl ketones from an incomplete β -oxidation of fatty acids (Fadda *et al.* 2002). Both species produced flavour compounds, such as methyl acids, methyl aldehydes and methyl alcohols from catabolism of branched chained amino acids (Montel

et al. 1998; Madsen *et al.* 2002; Beck *et al.* 2004). They also produced esters responsible for fruity notes in dry-fermented sausages (Talon *et al.* 1998).

Staphylococcus xylosus is often described in the literature as the dominant staphylococcal species isolated from naturally fermented sausages, contrary to *S. carnosus*, which is rarely found to be dominant in these products (Rebecchi *et al.* 1998; Papamanoli *et al.* 2002; Aymerich *et al.* 2003; Blaiotta *et al.* 2004). However, little is known about the implantation of these two species, used as starter cultures, during the sausage manufacture. Some authors have investigated the growth and the survival of *S. xylosus* during the fermentation of Italian sausage (Di Maria *et al.* 2002) and during the storage of traditional Italian fresh sausages (Rantsiou *et al.* 2005). But to our knowledge, no study concerning the growth and survival of *S. carnosus* has been published and the behaviour of both species, which are often used in mixed starter cultures for French sausage manufacturing, is yet unknown. Furthermore, the colonization of the environment of sausage-processing unit by *S. xylosus* and *S. carnosus* used as starters has never been evaluated.

The aim of this work was to monitor the growth and survival of *S. xylosus* and *S. carnosus*, used as starter cultures, through the process of two units manufacturing dry-fermented sausages. Furthermore, the colonization of the environment of the two units by the two species was studied. We used molecular methods, with first the identification of the isolates at the genus level by *Staphylococcus*-specific PCR, then identification of the species by hybridization with species-specific oligonucleotide array. Finally, the strains of *S. xylosus* and *S. carnosus* were typed by pulse-field gel electrophoresis (PFGE) in order to monitor the implantation of the starter strains through the manufacturing of the sausages and in the environment of two processing plants.

Materials and methods

Sausage manufacturing and sampling procedures

The *S. xylosus* and *S. carnosus*, starter strains were monitored through two French processing plants (PP), F10 and F11 manufacturing dry-fermented sausages. The plant F10 manufactured approximately 900 kg of sausages per year; the average weight of sausages was 270 g and diameter was 40 mm after drying. The plant F11 manufactured 5000 tons of sausages per year with an average weight of 350 g per sausage and diameter of 50 mm after drying. The batter composition and the manufacturing conditions of F10 and F11 are given in Table 1. The same commercial starter culture (Dried SA201; Rhodia Food, Dangé Saint Romain, France) was usually used in these two PP manufacturing sausages throughout the year. It was composed of a mix of strains belonging to the species *L. sakei*, *S. xylosus* and *S. carnosus*, recommended to be inoculated in the batter at a level of 10^6 CFU g⁻¹.

Five environmental samples were collected from each PP: two samples from the equipment (mincing-mixing and stuffing machines) and three from the surfaces (tables, walls of cold room, knives). The environmental samples were collected after cleaning-disinfecting procedures and just before the manufacturing of the sausages. Natural casings from pork were desalted by soaking prior to microbial analysis. Three meat samples per PP were collected: batter (Z), sausages after the fermentation period (M) and sausages at the end of ripening (F).

pH and a_w measurements

The pH of the meat samples was recorded using a pHmeter MP230 (Mettler Toledo, Viroflay, France) with a pH probe (Inlab 427 penetration probe; Mettler Toledo). The

Processing plants	F10	F11
Batter composition	90% lean pork, 10% fat 1% lactose, 1% dextrose 1.4% NaCl, 0.1% black pepper Potassium nitrate (0.20 g kg ⁻¹), garlic, wine	80% lean pork, 20% fat 1% lactose, 1% dextrose 1.4% NaCl, 0.1% black pepper Potassium nitrate (0.25 g kg ⁻¹), garlic
Starter cultures	<i>Staphylococcus xylosus</i> , <i>Staphylococcus carnosus</i> <i>Lactobacillus sakei</i>	<i>Staphylococcus xylosus</i> , <i>Staphylococcus carnosus</i> <i>Lactobacillus sakei</i>
Manufacturing conditions		
Fermentation	18 °C for 60 h at 90% RH*	24 °C for 30 h at 75–90% RH
Ripening	14 °C for 39 days at 83% RH	12 °C for 28 days at 75–85% RH

*, Relative humidity.

Table 1 Formulation of the batter and manufacturing conditions in the two processing plants

water activity (a_w) was measured with an a_w -sprint TH500 (Novasina, Roucaire, France).

Microbiological analysis

The environmental samples were collected after the cleaning–disinfecting procedures and before the manufacturing by swabbing 500 cm² of the surfaces with sterile cloths wet with a neutralizing solution (Humeau, La Chapelle-sur-Erdre, France). Sterile wet clothes were/ transferred to 25 ml of buffered peptone water solution (BPW; AES Laboratory, Combourg, France). For casings and meat samples, 25 g was transferred into a sterile stomacher bag with 225 ml of BPW solution (for the meat samples, the casing was removed aseptically). Then all the samples were homogenized with a Stomacher Lab-Blender 400 (Interscience, Saint-Nom la Bretonne, France) for 4 min. Serial decimal dilutions were prepared in BPW solution and 0.1-ml sample of appropriate dilutions was poured on mannitol salt phenol red agar (MSA; Merck, Darmstadt, Germany) incubated at 30 °C for 48 h to enumerate the gram-positive, catalase-positive cocci (GCC⁺). After counting, 20% of the representative colonies isolated were randomly selected from plates containing 30–300 colonies. The GCC⁺ isolates were streaked on brain heart infusion agar medium (BHI; Difco, Detroit, MI, USA) and stored at –80 °C in BHI broth containing 20% glycerol before analysis. A total of 202 and 238 GCC⁺ strains were isolated from F10 and F11 PPs, respectively.

Staphylococcus-specific PCR amplifications

The 440 isolates were identified by using the primers Tstag765/TstaG422, specific to the *Staphylococcus* genus (Martineau *et al.* 2001). The PCR reactions were performed as described, but 1 U of *Taq* DNA polymerase (Promega, Lyon Charbonnières, France) was used per reaction. The amplification cycle was as follows: 15 min at 4 °C, 3 min at 94 °C, then 40 cycles of 1 s at 95 °C, 30 s at 55 °C, 30 s at 72 °C and a final hold of 3 min at 72 °C with a GenAmp® PCR system 9700 PE thermal cycler (Perkin-Elmer, Courtaboeuf, France). The gel analysis was performed as previously described (Corbière Morot-Bizot *et al.* 2004).

Identification of *Staphylococcus* strains

We used an oligonucleotide array targeting the manganese-dependent superoxide dismutase gene (*sodA*) to identify the *Staphylococcus* strains. This array allowed the identification of the 36 species of *Staphylococcus* currently described, including *S. xylosus* and *S. carnosus* (Giammarinaro *et al.* 2005). The primers D1 and D2 were used to

amplify by PCR the internal part of the *sodA* gene as described by Poyart *et al.* (2001), but D2 was 5'-terminal digoxigenin-labelled. The labelled PCR products were heat denatured and hybridized with oligonucleotide probes applied to a membrane. The hybridized targets were detected with the Dig color detection kit (Roche, Meylan, France) as described by Giammarinaro *et al.* (2005).

PFGE typing of *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus carnosus* strains

Ten isolates of each *S. xylosus* and *S. carnosus* from the commercial starter lyophilisate were typed by PFGE. Forty-five and 30 isolates of *S. xylosus* isolated from the products of F10 and F11, respectively, were typed. Ten isolates of *S. carnosus* from the products of F10 and ten of F11 were also typed. Agarose plugs containing chromosomal DNA were prepared, digested with the *Sma*I endonuclease (Promega) according to the manufacturer's instructions and separated by PFGE in a contour-clamped homogeneous electric field apparatus CHEF-DRIII apparatus (Bio-Rad, Yvry, France) as previously described (Morot-Bizot *et al.* 2003). The pulse-field program was defined as follows: (i) pulse times of 10–30 s, 6 V cm^{–1}, with a running time of 23 h, and (ii) pulse times of 50–100 s, 6 V cm^{–1}, with a running time of 1 h. Lambda ladder (Promega) was used as molecular weight marker. Gels were stained with ethidium bromide and digitalized with the Gel Doc 2000 apparatus (Bio-Rad).

Results

GCC⁺ counts, pH and a_w measurements

The GCC⁺ counts of the meat samples and the casings were enumerated and the decrease of pH and water activity was measured during the process in the sausages from the two PPs. The batters inoculated with *Staphylococcus* starters had a GCC⁺ level of 8·10⁵ CFU g^{–1}. In the F10 PP, the GCC⁺ counts increased during all the process, reaching 2·10⁶ CFU g^{–1} after the fermentation period and 2·10⁷ CFU g^{–1} at the end of ripening. The pH dropped from 5·7 to 5·3 during the fermentation and then remained constant. The water activity decreased during all the process from 0·972 to 0·883 after 39 days of manufacturing. In the F11 PP, the GCC⁺ counts reached 2·10⁷ CFU g^{–1} during the fermentation and then remained quite stable (1·10⁷ CFU g^{–1}). The pH dropped from 5·9 to 5·3 during the fermentation and then increased slightly up to 5·4 during the ripening. The water activity decreased during all the process from 0·963 to 0·846 after 28 days of manufacturing. The casings were contaminated by 2·10³ CFU g^{–1} and 4·10⁴ CFU g^{–1} of GCC⁺ in the F10 and F11 PPs, respectively.

The levels of contamination by GCC⁺ were found very low in the environmental samples of both PPs. In the F10 PP, the knives, the mincing–mixing machine and the stuffing machine were contaminated by GCC⁺ up to $4 \cdot 10^2$ CFU (100 cm²)⁻¹. In the F11 PP, the knives and the tables were contaminated by GCC⁺ at a maximum level of about $7 \cdot 10^2$ CFU (100 cm²)⁻¹.

Identification of *Staphylococcus* strains in the meat and environmental samples

The *Staphylococcus*-specific PCR assays revealed that 164 isolates out of the 202 GCC⁺ in F10 and 172 out of the 238 GCC⁺ in F11 belonged to the *Staphylococcus* genus. In the F10 PP, 135 *Staphylococcus* strains were isolated from the different meat samples: batter (Z), sausages after fermentation period (M) and sausages at the end of the ripening (F). Four strains were isolated from casings and 25 from environmental samples. In the F11 PP, 131 strains were from the meat samples (Z, M, F), 8 from casings and 33 from environmental samples.

All the isolates of *Staphylococcus* were identified at the species level by the analysis of oligonucleotide array, each species showing a specific pattern of hybridization as reported by Giammarinaro *et al.* (2005). In both PPs, all the isolates from the meat samples, but three, were identified as *S. xylosus* (121 and 135 in F10 and F11, respectively) or *S. carnosus* (14 in F10, 27 in F11) (Table 2). The remaining three isolates from F11 were identified as two *Staphylococcus equorum* and one *Staphylococcus sciuri*. The batters of the two PPs were inoculated by both species in close ratio: *S. xylosus* 57% of isolates in F10 and 53% in F11, *S. carnosus* 43% in F10 and 47% in F11 (Table 2). But, *S. xylosus* became dominant among the staphylococcal microbiota in the sausages of the two PPs following the fermentation step (Table 2). They represented 98% of *Staphylococcus* isolates in F10 and 90% in F11 in the sausages at the end of ripening. *Staphylococcus carnosus* sur-

vived during the process in F10 and represented 2% of the isolates in the final products. In F11 PP, *S. carnosus* represented 9% and 5% of the *Staphylococcus* isolates at the fermentation step and at the end of ripening, respectively.

No *S. xylosus* and *S. carnosus* were identified in the casing samples. The four isolates from the casings of F10 PP were identified as two *S. equorum* and two *Staphylococcus succinus*. In the F11 PP, the eight isolates from the casings were identified as seven *S. equorum* and one *Staphylococcus simulans*.

No *S. xylosus* and *S. carnosus* were isolated from the environmental samples of the two PPs. In the F10 PP, the 25 isolates were identified as eight *S. equorum*, two *Staphylococcus pasteurii* and 13 *Staphylococcus saprophyticus* from knives and stuffing machine, one *Staphylococcus vitulinus* and one *Staphylococcus epidermidis* from knives. In the F11 PP, the 33 isolates were identified as 27 *S. equorum* from tables, five *S. saprophyticus* and one *Staphylococcus fleuretti* from knives.

Typing of the *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus carnosus* strains by PFGE

Two subtypes of *Sma*I PFGE patterns of *S. xylosus* were found among the ten isolates of the commercial starter suggesting the presence of two strains of *S. xylosus*. Four isolates exhibited the pattern A1 (isolate St1, Fig. 1) and six isolates had the pattern A2 (St2, Fig. 1). All the isolates identified as *S. xylosus* in the two PPs exhibited only these two patterns (Fig. 1). These two subtypes were found through the entire sausage manufacture process in the two PPs. But the pattern A1 was found dominant in the F10 PP with 40 isolates exhibiting the pattern A1 and five the pattern A2. Among the 30 isolates of the F11 PP, 14 had the pattern A1 and 16 the pattern A2.

The *S. carnosus* isolates of the commercial starter exhibited one PFGE pattern called B after *Sma*I restriction of DNA (Fig. 2). All the isolates of *S. carnosus* had the same pulsotype, which was identical to the starter strain.

Table 2 Distribution of *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus carnosus* isolates from meat samples of the processing plants F10 and F11

Processing plants	Isolates	Z*	M†	F‡	Total
F10	<i>Staphylococcus</i>	30§	42	63	135
	<i>Staph. xylosus</i>	17	42	62	121
	<i>Staph. carnosus</i>	13	0	1	14
F11	<i>Staphylococcus</i>	45	45	41	131
	<i>Staph. xylosus</i>	24	40	37	101
	<i>Staph. carnosus</i>	21	4	2	27

*, Batter.

†, Sausages after the fermentation period.

‡, Sausages at the end of ripening.

§, Number of isolates.

Discussion

The GCC⁺ counts in the sausages of the two processing plants were different. In the F10 PP, the population increased during the entire process and in the F11 PP, it increased only during the fermentation step. These two behaviours had already been mentioned in sausages inoculated with starter cultures (Rebecchi *et al.* 1998; Di Maria *et al.* 2002) or without starter cultures (Coppola *et al.* 2000; Mauriello *et al.* 2004). The difference in evolution of GCC⁺ counts in the two sausages manufacturing could be attributed to differences in the formulation of

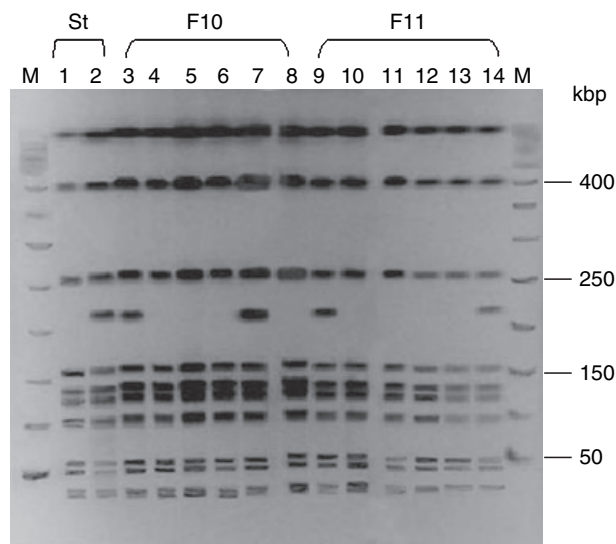


Figure 1 Pulse-field gel electrophoresis patterns of *Smal* restricted genomic DNA of *Staphylococcus xylosus* isolates from commercial starter (St) and from F10 and F11 processing plants. Lane M, ProMega-Markers® Lambda ladder (Promega); lane 1, isolate 1 of St; lane 2, isolate 2 of St; lane 3, F10Z55; lane 4, F10Z34; lane 5, F10M63; lane 6, F10M20; lane 7, F10F48; lane 8, F10F51; lane 9, F11Z15; lane 10, F11Z24; lane 11, F11M29; lane 12, F11M66; lane 13, F11F27; lane 14, F11F18.

the batter, mainly a different ratio between lean and fat and different initial pH of the batter. It could also be attributed to the fermentation and ripening conditions. Thus, the growth of GCC⁺ in the sausages of the F11 PP during the fermentation could be due to high initial pH and high temperature. Then the low temperature (12 °C) and the drop of water activity (0.12 units) during the 28 days of ripening could explain the inhibition of growth during this step. In the process of the F10 PP, the difference of temperature between the fermentation and the ripening was not important (4 °C) and the decrease of water activity was low (0.08 units) during a long period (39 days). These conditions had allowed the growth of the GCC⁺ during all the process.

Staphylococcus xylosus and *S. carnosus* are the two staphylococcal species developed as commercial starters for the fermentation of dry sausages. They are inoculated either separately or mixed always with a LAB. To our knowledge, their growth and survival when inoculated as mixed starters in sausage had never been described in published studies. Some authors had studied the diversity of the coagulase-negative staphylococci (CNS) in traditional fermented sausages. Thus, it is well established that *S. xylosus* is the dominant CNS in many Italian sausages (Coppola et al. 1997; Cocolin et al. 2001; Rossi et al. 2001; Blaiotta et al. 2004) and in Spanish sausages (Gar-

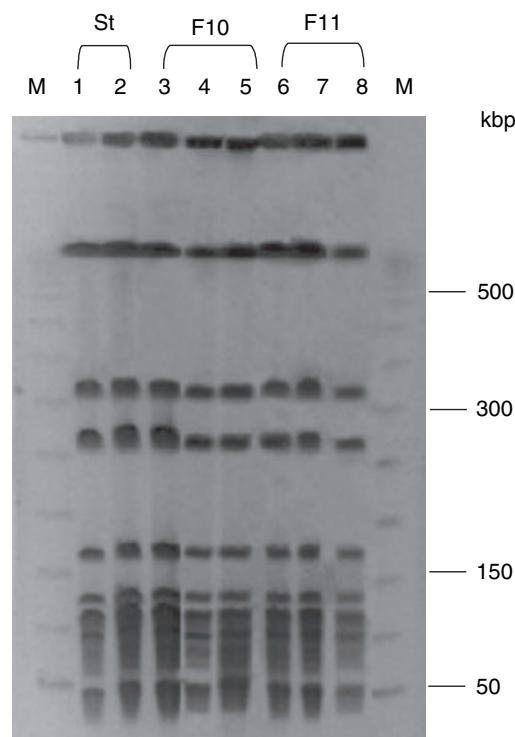


Figure 2 Pulse-field gel electrophoresis patterns of *Smal* restricted genomic DNA of *Staphylococcus carnosus* isolates from commercial starter (St) and from F10 and F11 processing plants. Lane M, ProMega-Markers® Lambda ladder (Promega); lane 1, isolate 1 of St; lane 2, isolate 2 of St; lane 3, F10Z17; lane 4, F10Z21; lane 5, F10F25; lane 6, F11Z07; lane 7, F11M25; lane 8, F11F01.

cia-Varona et al. 2000; Aymerich et al. 2003). *Staphylococcus carnosus* and *S. saprophyticus* constituted an important part of the microbiota in Greek sausages (Samelis et al. 1998; Papamanoli et al. 2002) and in Naples type salami (Coppola et al. 2000). One study had monitored the growth of the *S. xylosus* DSM 20266 strain inoculated in Italian sausage (Di Maria et al. 2002). The authors showed that this strain grew during the process but from day 14, it was not competitive compared with the indigenous *S. xylosus* strains that increased progressively reaching 50% at day 28. The strain DSM 20266 was first isolated from human skin (Kloos et al. 1976); thus, it may not be really adapted to this meat ecosystem. In our study, the mixed meat starter *S. xylosus* and *S. carnosus* outgrew the indigenous microbiota in the two processing plants. *Staphylococcus xylosus* dominated the staphylococcal microbiota since the fermentation step and constituted up to 98% of the population at the end of ripening, while *S. carnosus* survived during the entire process.

Staphylococcus xylosus starter was composed of two different strains as shown by PFGE analysis in a ratio 0.4/0.6. The two strains of patterns A1 and A2 were found at

each processing step, but did not grow similarly in the two PPs. In the F10 PP, the *S. xylosus* strain with pattern A1 was found dominant along the process. In the F11 PP, the strains with patterns A1 and A2 were found in the same ratio along the process. The processing conditions could explain these differences; in particular, the lower temperature in F10 seemed more favourable to the growth of the strain with pattern A1.

Staphylococcus carnosus starter in mixed condition was supplanted by *S. xylosus* but survived during the entire process. These results corroborated the ones from natural fermented sausages, i.e. *S. xylosus* is more frequently isolated than *S. carnosus*; thus, it seemed more adapted to meat fermentation process.

Staphylococcus xylosus and *S. carnosus* did not colonize the environment of the two processing plants. The environments were weakly colonized by *Staphylococcus*. The two main species that colonized them were *S. equorum* representing 60% of the isolates and *S. saprophyticus* representing 31% of the isolates. In our laboratory we have already shown, that *S. equorum* had great capacity to colonize the environment and the products of a processing unit manufacturing sausages without starter (Corbière Morot-Bizot et al. 2006). In this processing unit, *S. xylosus* and *S. carnosus* were rarely isolated in the environment.

In conclusion, this work highlighted the strong capacity of *S. xylosus* starter strains to grow in sausage manufactured according two different processes, while *S. carnosus* starter strain survived during these processes. These two species that outgrew the indigenous microbiota were adapted for the manufacturing of sausages in very small and intermediate plants. It was noteworthy that neither *S. xylosus* nor *S. carnosus* strains were able to colonize the environment of the two processing plants.

Acknowledgements

Part of this work was financially supported by a European contract: Tradisausage QLK1-CT-2002-02240. We are grateful to Jean-Paul Chacornac and Brigitte Duclos for technical assistance. S. Corbière Morot-Bizot has a research fellowship from the French Ministry of 'Education Nationale et Recherche'.

References

- Aymerich, T., Martin, B., Garriga, M. and Hugas, M. (2003) Microbial quality and direct PCR identification of lactic acid bacteria and nonpathogenic staphylococci from artisanal low-acid sausages. *Appl Environ Microbiol* **69**, 4583–4594.
- Barrière, C., Leroy-Sétrin, S. and Talon, R. (2001) Characterization of catalase and superoxide dismutase in *Staphylococcus carnosus* 833 strain. *J Appl Microbiol* **91**, 514–519.
- Beck, H.C., Hansen, A.M. and Lauritsen, F.R. (2004) Catabolism of leucine to branched-chain fatty acids in *Staphylococcus xylosus*. *J Appl Microbiol* **96**, 1185–1193.
- Blaiotta, G., Pennacchia, C., Villani, F., Ricciardi, A., Tofalo, R. and Parente, E. (2004) Diversity and dynamics of communities of coagulase-negative staphylococci in traditional fermented sausages. *J Appl Microbiol* **97**, 271–284.
- Cocolin, L., Manzano, M., Cantoni, C. and Comi, G. (2001) Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the 16S rRNA gene V1 region to monitor dynamic changes in the bacterial population during fermentation of Italian sausages. *Appl Environ Microbiol* **67**, 5113–5121.
- Coppola, R., Iorizzo, M., Saotta, R., Sorrentino, E. and Grazia, L. (1997) Characterization of micrococci and staphylococci isolated from soppressata molisana, a Southern Italy fermented sausage. *Food Microbiol* **14**, 47–53.
- Coppola, S., Mauriello, G., Aponte, M., Moschetti, G. and Villani, F. (2000) Microbial succession during ripening of Naples-type salami, a southern Italian fermented sausage. *Meat Sci* **56**, 321–329.
- Corbière Morot-Bizot, S., Talon, R. and Leroy, S. (2004) Development of a multiplex PCR for the identification of *Staphylococcus* genus and four staphylococcal species isolated from food. *J Appl Microbiol* **97**, 1087–1094.
- Corbière Morot-Bizot, S., Talon, R. and Leroy, S. (2006) Staphylococcal community of a small processing unit manufacturing traditional dry fermented sausages. *Int J Food Microbiol* **108**, 210–217.
- Di Maria, S., Basso, A.L., Santoro, E., Grazia, L. and Coppola, R. (2002) Monitoring of *Staphylococcus xylosus* DSM 20266 added as starter during fermentation and ripening of soppressata molisana, a typical Italian sausage. *J Appl Microbiol* **92**, 158–164.
- Fadda, S., Lebert, A., Leroy-Sétrin, S. and Talon, R. (2002) Decarboxylase activity involved in methyl ketone production by *Staphylococcus carnosus* 833, a strain used in sausage fermentation. *FEMS Microbiol Lett* **210**, 209–214.
- García-Varona, M., Santos, E.M., Jaime, I. and Rovira, J. (2000) Characterization of *Micrococcaceae* isolated from different varieties of chorizo. *Int J Food Microbiol* **54**, 189–195.
- Giammarinaro, P., Leroy, S., Chacornac, J.-P., Delmas, J. and Talon, R. (2005) Development of a new oligonucleotide array to identify staphylococcal strains at species level. *J Clin Microbiol* **43**, 3673–3680.
- Kloos, W.E., Zimmerman, R.J. and Smith, R.F. (1976) Preliminary studies on the characterization and distribution of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species on animal skin. *Appl Environ Microbiol* **31**, 53–59.
- Madsen, S.M., Beck, H.C., Ravn, P., Vrang, A., Hansen, A.M. and Israelsen, H. (2002) Cloning and inactivation of a branched-chain-amino-acid aminotransferase gene from *Staphylococcus carnosus* and characterization of the enzyme. *Appl Environ Microbiol* **68**, 4007–4014.

- Martineau, F., Picard, F.J., Ke, D., Paradis, S., Roy, P.H., Ouellette, M. and Bergeron, M.G. (2001) Development of a PCR assay for identification of staphylococci at genus and species levels. *J Clin Microbiol* **39**, 2541–2547.
- Mauriello, G., Casaburi, A., Blaiotta, G. and Villani, F. (2004) Isolation and technological properties of coagulase negative *staphylococci* from fermented sausages of Southern Italy. *Meat Sci* **67**, 149–158.
- Montel, M. C., Masson, F. and Talon, R. (1998) Bacterial role in flavour development. *Meat Sci* **49**, 111–123.
- Morot-Bizot, S., Talon, R. and Leroy-Sétrin, S. (2003) Development of specific PCR primers for a rapid and accurate identification of *Staphylococcus xylosus*, a species used in food fermentation. *J Microbiol Methods* **55**, 279–286.
- Papamanoli, E., Kotzekidou, P., Tzanetakis, N. and Litopoulou-Tzanetaki, E. (2002) Characterization of *Micrococcaceae* isolated from dry fermented sausage. *Food Microbiol* **19**, 441–449.
- Poyart, C., Quesne, G., Boumaila, C. and Trieu-Cuot, P. (2001) Rapid and accurate species-level identification of coagulase-negative staphylococci by using the *sodA* gene as a target. *J Clin Microbiol* **39**, 4296–4301.
- Rantsiou, K., Iacumin, L., Cantoni, C., Comi, G. and Coccolin, L. (2005) Ecology and characterization by molecular methods of *Staphylococcus* species isolated from fresh sausages. *Int J Food Microbiol* **97**, 277–284.
- Rebecchi, A., Crivori, S., Sarra, P.G. and Cocconcetti, P.S. (1998) Physiological and molecular techniques for the study of bacterial community development in sausage fermentation. *J Appl Microbiol* **84**, 1043–1049.
- Rossi, F., Tofalo, R., Torriani, S. and Suzzi, G. (2001) Identification by 16S-23S rDNA intergenic region amplification, genotypic and phenotypic clustering of *Staphylococcus xylosus* strains from dry sausages. *J Appl Microbiol* **90**, 365–371.
- Samelis, J., Metaxopoulos, J., Vlassi, M. and Pappa, A. (1998) Stability and safety of traditional Greek salami – a microbiological ecology study. *Int J Food Microbiol* **44**, 69–82.
- Talon, R., Leroy-Sétrin, S. and Fadda, S. (2002) Bacterial starters involved in the quality of fermented meat products. In *Handbook of Research Advances in Quality of Meat and Meat Products* ed. Toldrá, F. pp. 175–191. India: Research Signpost.
- Talon, R., Chastagnac, C., Vergnais, L., Montel, M.C. and Berdagué, J.L. (1998) Production of esters by Staphylococci. *Int J Food Microbiol* **45**, 143–150.
- Talon, R., Walter, D., Chartier, S., Barrière, C. and Montel, M.C. (1999) Effect of nitrate and incubation conditions on the production of catalase and nitrate reductase by staphylococci. *Int J Food Microbiol* **52**, 47–56.

DISCUSSION

IDENTIFICATION DES STAPHYLOCOQUES A COAGULASE NEGATIVE ISOLÉS DE LA FLORE DES SALAISONS ET DE L'ENVIRONNEMENT DES ATELIERS DE PRODUCTION

En raison de leur caractère ubiquitaire et du fait que certaines espèces sont pathogènes opportunistes et peuvent présenter un risque pour la santé humaine, les staphylocoques à coagulase négative (SCN) sont de plus en plus étudiés, que ce soit dans les environnements cliniques ou agro-alimentaires.

Les SCN sont présents naturellement ou ajoutés comme ferments lors de la fabrication de produits fermentés carnés et assurent une part importante de la typicité des produits. Ainsi, la flore staphylococcace des salaisons a fait l'objet de nombreuses études. Cependant beaucoup de ces travaux se basent sur une identification des SCN par des tests phénotypiques, telles que les galeries API-Staph. Or depuis quelques années, les tests phénotypiques pour l'identification des différentes espèces de staphylocoques sont remis en cause. Dès 1996, Goh *et al.* (1996) avaient observé que 35% de souches de SCN d'origine clinique étaient mal identifiées par les galeries API-Staph. Les auteurs avaient émis l'hypothèse que ces tests ne permettaient pas une bonne discrimination entre les espèces en raison du nombre trop restreint de caractères biochimiques suffisamment stables au sein d'une même espèce. Plus récemment, Coppola *et al.* (2000) ont montré que 82% des souches de staphylocoques isolées de saucissons secs étaient non identifiées au niveau de l'espèce par ces méthodes. D'autres auteurs sont arrivés à la conclusion que les galeries API-Staph, initialement développées pour l'identification de souches d'origine clinique, induisaient des identifications erronées ou ne permettaient pas l'identification de la majorité des souches isolées de l'environnement ou de produits alimentaires (Bascomb & Manafi, 1998 ; Rossi, *et al.* , 2001; Poyart *et al.*, 2001).

L'introduction de méthodes moléculaires a permis une meilleure identification des staphylocoques au niveau de l'espèce. Des méthodes d'identification basées sur le séquençage d'un gène cible, conservé au sein du genre mais variable entre espèce, tels que les gènes *hsp60*, *sodA* et *rpoB* ont été développées (Goh *et al.*, 1997 ; Poyart *et al.*, 2001 ; Drancourt & Raoult, 2002). Ces méthodes sont fiables mais sont trop longues et trop coûteuses pour être utilisées en routine sur un grand nombre d'échantillons. Le développement de méthodes basées sur des PCR spécifiques d'une espèce a permis une amélioration de l'identification des

staphylocoques. Des amorces spécifiques d'espèce ont ainsi été validées pour l'identification de staphylocoques pathogènes opportunistes, *S. aureus* (Hookey *et al.*, 1998; Martineau *et al.*, 1998 ; Pinto *et al.*, 2005), *S. epidermidis* (Martineau *et al.*, 1996 ; Forsman *et al.*, 1997 ; Stuhlmeier & Stuhlmeier, 2003) et *S. saprophyticus* (Martineau *et al.*, 2000). Des amorces spécifiques de l'espèce *S. xylosus*, espèce très fréquemment isolée des environnements agro-alimentaires, avaient également été développées et appliquées à 4 souches isolées de mammites (Forsman *et al.*, 1997). Ces amorces ciblaient la région inter génique 16S-23S. Après plusieurs essais au laboratoire, nous n'avons jamais réussi à amplifier un produit spécifique de *S. xylosus* (résultats non présentés).

Pour pouvoir identifier rapidement et de manière fiable les souches appartenant à l'espèce *S. xylosus*, nous avons développé des amorces ciblant un fragment, obtenu par RAPD, spécifique de l'espèce *S. xylosus* (Morot-Bizot *et al.*, 2003). Le produit amplifié est directement analysable sur gel d'agarose. Cet outil appliqué à l'identification de souches isolées de salaisons et de produits laitiers a révélé que plusieurs souches identifiées à l'espèce *S. xylosus* par des tests phénotypiques n'appartenaient pas à cette espèce. En parallèle à ce travail, d'autres équipes en Espagne et en Italie développaient des amorces spécifiques pour l'identification par PCR de l'espèce *S. xylosus* (Aymerich *et al.*, 2003 ; Blaiotta *et al.*, 2003b). Les travaux de Blaiotta *et al.* (2003b) ont porté sur la détermination d'amorces ciblant le gène codant la xylulokinase ou le gène codant une protéine de choc thermique de 60 kDa. Cependant, la spécificité des produits amplifiés ne peut être assurée qu'après restriction enzymatique avant l'analyse sur gel. Les amorces mises au point par Aymerich *et al.* (2003) ciblaient la région inter génique 16S-23S générant plusieurs produits spécifiques ce qui rend l'analyse des résultats difficiles et qui ne permet pas d'utiliser ces amorces dans une PCR multiplex. Plus récemment, en 2005, Rantsiou *et al.* (2005b) ont développé des amorces ciblant le gène *gehM* codant une lipase. Le développement de ces différentes méthodes souligne bien l'intérêt porté à l'espèce *S. xylosus* et la nécessité d'assurer son identification. Parmi ces outils, la PCR spécifique de *S. xylosus* que nous avons développée est la seule qui peut être appliquée directement sur colonies, ne nécessitant aucune préparation d'ADN (Morot-Bizot *et al.*, 2003).

Il nous a semblé intéressant de développer une PCR multiplex ciblant *S. xylosus* et les staphylocoques pathogènes opportunistes identifiables par PCR et isolés des environnements agro-alimentaires, *S. aureus*, *S. epidermidis* et *S. saprophyticus*. La taille des produits amplifiés étant compatibles pour une analyse directe sur gel d'agarose, nous avons optimisé les conditions de PCR pour pouvoir co-amplifier ces produits spécifiques directement à partir

d'une colonie. Nous avons ajouté à ce mélange réactionnel les amorces spécifiques au genre *Staphylococcus* développées par Martineau *et al.* (2001) afin de pouvoir l'utiliser directement à partir des colonies de type coques à Gram positif et catalase positive (CGC⁺) isolées sur les milieux sélectifs de type Chapman ou Baird Parker. Après validation de cette PCR multiplex, nous l'avons appliquée à l'identification de souches, isolées sur milieu sélectif Chapman, originaires de saucissons et de l'environnement d'un atelier traditionnel et montré une prédominance de souches de *S. saprophyticus* (Corbière Morot-Bizot *et al.*, 2004). Cette prédominance avait déjà été observée parmi les isolats de saucissons grecs naturellement fermentés (Papamanoli *et al.*, 2002).

L'étude de la flore CGC⁺ d'un atelier fabriquant des salaisons naturellement fermentées, a montré une domination de cette flore par le genre *Staphylococcus* (94% des isolats) (Corbière Morot-Bizot *et al.*, 2006). Cette flore atteint des niveaux de population dans le saucisson en fin de sèche compris entre 10⁶ et 10⁸ UFC/g, niveaux proches de ceux observés pour des saucissons traditionnels espagnols (Aymerich *et al.*, 2003). La colonisation était relativement dense dans tous les échantillons de l'environnement de l'atelier, ce qui montre que celui-ci a offert des conditions favorables à la survie des staphylocoques. Les échantillons les plus colonisés étaient la chambre froide, le séchoir, le billot et les tables de découpe. Ce sont les premiers résultats étudiant la colonisation des ateliers de salaisons par des staphylocoques.

L'identification des SCN au niveau de l'espèce par PCR multiplex, PFGE et séquençage du gène *sodA* a révélé une diversité staphylococcale conditionnée par les saisons et donc potentiellement sous dépendance de la variabilité de la température ambiante de l'atelier. Ainsi, sept espèces étaient identifiées pendant la saison printanière. *S. equorum* (49%) et *S. succinus* (33%) étaient les espèces dominantes, capables de coloniser à la fois les produits carnés et l'environnement, tandis que cinq autres espèces, plus minoritaires, étaient identifiées, telles que *S. saprophyticus*, *S. xylosus*, *S. carnosus*, *S. simulans* et *S. warneri*. Pendant la saison hivernale, seules cinq espèces étaient isolées, *S. equorum*, *S. succinus*, *S. saprophyticus*, *S. simulans* et *S. warneri* (Corbière Morot-Bizot *et al.*, 2006).

Les espèces *S. equorum* et *S. succinus* n'ont été que très récemment décrites dans la flore des saucissons secs fermentés. Ainsi, Blaiotta *et al.* (2004a) en étudiant la diversité des SCN dans les saucissons naturellement fermentés isolèrent 10% de souches de *S. equorum* et 2% de souches de *S. succinus*. Dans d'autres saucissons italiens, *S. equorum* pouvait représenter jusqu'à 40% de la flore staphylococcale (Mauriello *et al.*, 2004). *S. equorum* est

majoritairement présent dans le jambon cru (Rodriguez *et al.*, 1996) et le fromage (Irlinger *et al.*, 1997 ; Bockelmann & Hoppe-Seyler, 2001 ; Ercolini *et al.*, 2003). De plus, un nombre non négligeable de souches de cette espèce a été isolé du sel utilisé pour le saumurage des jambons crus (Cordero & Zumalacarregui, 2000). Cette espèce a été proposée comme ferment pour l'affinage des fromages via la description d'une nouvelle sous-espèce, *S. equorum* subsp. *linens* (Bockelmann & Hoppe-Seyler, 2001) et pour la fermentation des produits carnés (Hammes & Hertel, 1998 ; Sondergaard & Stahnke, 2002) du fait de son halotolérance, de sa capacité à croître à basse température et de ses propriétés protéolytiques et lipolytiques (Blaiotta *et al.*, 2004c).

La présence de *S. equorum* dans les salaisons a jusqu'à récemment été probablement sous-estimée du fait des problèmes pour discriminer phénotypiquement les espèces *S. equorum* et *S. xylosus*. Sondergaard et Stahnke (2002) ont rapporté que des souches de *S. xylosus* d'origine carnée, identifiées biochimiquement, se sont avérées appartenir à l'espèce *S. equorum*, après analyse des séquences de l'ADNr 16S. Des résultats similaires obtenus par Blaiotta *et al.* (2003b) et Mauriello *et al.* (2004) ont révélé que dans de nombreux cas, les espèces *S. equorum*, *S. lentus*, *S. warneri* et *S. saprophyticus* pouvaient être identifiées à l'espèce *S. xylosus* par les méthodes biochimiques, de même que certaines souches de *S. xylosus* pouvaient être assignées aux espèces *S. saprophyticus*, *S. sciuri*, *S. epidermidis* ou *S. intermedius*.

La caractérisation par PFGE des 201 souches de *S. equorum* isolées de l'atelier a révélé une grande diversité avec huit pulsotypes distincts. Cependant, un pulsotype dominant regroupant 77 souches était trouvé dans l'environnement de l'atelier et dans les saucissons révélant que certaines souches semblent bien adaptées pour survivre dans cet écosystème (Corbière Morot-Bizot *et al.*, 2006).

S. succinus est la deuxième espèce dominante dans l'atelier que nous avons étudié. Cette espèce est rarement décrite dans les aliments. Quelques souches de *S. succinus* ont été isolées dans la flore de fromages affinés (Place *et al.*, 2002), ainsi que dans la flore de saucissons fermentés et de saucisses fraîches (Blaiotta *et al.*, 2003a ; Rantsiou *et al.*, 2005b). Dans notre étude, la plupart des souches de *S. succinus* ont été isolées durant les échantillonnages de printemps, suggérant une meilleure colonisation lorsque les températures sont plus favorables à leur croissance, contrairement à *S. equorum* qui se développe même à des températures inférieures à 10°C (Mauriello *et al.*, 2004). De plus, le pulsotypage de ces souches a révélé trois pulsotypes, dont un était dominant puisqu'il était présent chez 86% des isolats de *S. succinus*.

S. saprophyticus représente 6% de la flore staphylococcale de l'atelier étudié. C'est une espèce fréquemment isolée des salamis grecs (Samelis *et al.*, 1998). L'étude de Papamanoli *et al.* (2002) confirme que *S. saprophyticus* représente 22% de la flore de salamis grecs, contre seulement 10% par *S. xylosus*. Des souches de *S. saprophyticus* et *S. warneri* ont été isolées de saucissons secs français (Montel *et al.*, 1992). Ces auteurs ont évalué le potentiel aromatique des souches de *S. saprophyticus* (Montel *et al.*, 1993). Certains travaux suggéraient que l'utilisation de certaines souches de cette espèce, présentant de fortes activités SOD et catalase, pourraient prévenir l'apparition d'arrière-goûts désagréables, dus à l'oxydation des lipides durant la fermentation des saucissons (Mauriello *et al.*, 2004). Cependant, *S. saprophyticus* est décrite comme une espèce pathogène opportuniste impliquée dans des infections urinaires (Martineau *et al.*, 2000). Il est donc indispensable de caractériser la diversité des souches d'origines clinique ou alimentaire. L'espèce *S. warneri*, très minoritaire dans l'atelier étudié (1%), serait dotée de la plus forte activité lipolytique parmi tous les staphylocoques (Montel *et al.*, 1993). Mauriello *et al.* (2004) ont montré que cette espèce est capable de libérer entre 16 et 35% d'acides gras de la matrice carnée lui conférant des potentialités aromatiques intéressantes.

Généralement, diverses espèces sont dénombrées en début de fabrication et leur nombre diminue durant le processus de fermentation des saucissons, au profit d'espèces plus compétitrices telle que *S. equorum* (Blaiotta *et al.*, 2004a). De même, *S. equorum* est l'espèce dominante dans les saucissons traditionnels en fin de sèche que nous avons étudiés (Corbière Morot-Bizot *et al.*, 2006).

S. carnosus et *S. xylosus* sont les deux principales espèces de SCN utilisées comme ferments dans l'industrie de la salaison. Néanmoins, lors de l'analyse de la flore staphylococcale d'un atelier traditionnel, ces deux espèces se sont révélées minoritaires (5% de la flore). Or plusieurs travaux portant sur la diversité des SCN dans les saucissons naturellement fermentés en Espagne et en Italie ont montré que *S. xylosus* était l'espèce dominante (Coppola *et al.*, 2000 ; Cocolin *et al.*, 2004 ; Blaiotta *et al.*, 2004a ; Aymerich *et al.*, 2003). C'est pourquoi, il est apparu intéressant d'étudier l'implantation des ferments *S. xylosus* et *S. carnosus* dans des saucissons artisanaux et industriels français et de déterminer leur potentiel à coloniser deux ateliers producteurs de salaisons (Corbière Morot-Bizot *et al.*, 2006). A notre connaissance, l'étude de leur implantation tout au long de la fabrication des saucissons secs n'avait jamais été publiée. Une seule étude s'était attachée à suivre l'évolution du ferment *S. xylosus* dans la fabrication de saucissons secs italiens et a montré la faible capacité de la souche de ferment à s'implanter face aux souches indigènes (Di

Maria *et al.*, 2002). Dans les deux types de saucissons, artisanaux et industriels, les ferments *S. carnosus* et *S. xylosus* ont supplanté la flore indigène tout au long du procédé de fabrication. Néanmoins, l'espèce *S. xylosus* s'est révélée dominante dès la phase d'étuvage tandis que l'espèce *S. carnosus* survit tout au long du procédé. Ces deux espèces n'ont pas été isolées dans l'environnement des ateliers étudiés. Par contre, les espèces *S. equorum* (60%), *S. saprophyticus* (31%), *S. pasteurii* (3%), *S. epidermidis* (2%), *S. fleurettii* (2%) et *S. vitulinus* (2%) ont été identifiées. *S. equorum* et *S. saprophyticus* semblent être deux espèces particulièrement bien adaptées pour survivre dans des ateliers de salaisons traditionnelles, artisanales et industrielles.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La France est un important producteur de salaisons avec une production annuelle de saucissons secs d'environ 110 000 tonnes. Cinquante pour cent du marché sont détenus par un groupe industriel, le reste étant détenu par une multitude de petits salaisonniers. Tous les professionnels de la salaison se doivent de concilier la qualité organoleptique et la qualité hygiénique de leurs produits. La production française de saucissons secs est caractérisée par deux types de production, l'une dite industrielle ou artisanale dans laquelle des ferments sélectionnés sont ensemencés, l'autre dite traditionnelle où la fermentation est réalisée par la flore naturellement présente. L'utilisation de ferments sélectionnés permet de sécuriser les produits mais a tendance à uniformiser les produits, contribuant à une perte de leur typicité.

Les staphylocoques à coagulase négative (SCN) contribuent notablement à la typicité des produits carnés fermentés. Ils sont présents naturellement ou ajoutés comme ferments lors de la fabrication. Parmi les SCN, certaines espèces sont d'intérêt technologique, commensales ou pathogènes opportunistes, il est donc indispensable de pouvoir les identifier et les caractériser.

Dans une première étape, nous avons développé et validé une méthode moléculaire basée sur une PCR pour identifier spécifiquement *Staphylococcus xylosus*, décrite comme la principale espèce présente naturellement dans les produits carnés fermentés et utilisée comme ferment. Nous avons ensuite mis au point une PCR multiplex ciblant *S. xylosus* et les staphylocoques pathogènes opportunistes isolés des environnements agro-alimentaires - *S. aureus*, *S. epidermidis* et *S. saprophyticus*- et permettant l'identification du genre *Staphylococcus*. Nous avons appliqué ces outils à l'identification de coques à Gram positif et catalase positive isolés de saucissons et de l'environnement de différents ateliers de fabrication. De plus, les outils que nous avons développés, PCR spécifique *S. xylosus* et PCR multiplex genre *Staphylococcus* et espèces, ont été largement utilisés par les différents partenaires du projet Européen « Tradisausage » (2003-2005). Ils sont utilisés en ce moment dans le cadre du projet ANR « SCN/BEER » (2006-2008) et ont été transmis dans plusieurs centres techniques (ADIV, AERIAL, ADRIA Normandie). Ces outils peuvent être utilisés très facilement, cependant ils permettent uniquement l'identification d'un nombre restreint d'espèces et parmi les souches isolées des salaisons et de leur environnement, un certain nombre restait non identifié.

Pour identifier les différentes espèces de SCN présentes dans des ateliers producteurs de salaisons traditionnelles, artisanales ou industrielles et étudier leur diversité, nous avons utilisé ces méthodes d'identification par PCR et des méthodes complémentaires basées sur la caractérisation des souches par analyse en électrophorèse en champs pulsé après macro restriction de l'ADN, par séquençage partiel du gène *sodA* et par hybridation avec des sondes oligonucléotidiques spécifiques.

Dans l'atelier traditionnel que nous avons étudié, les SCN colonisent aussi bien l'environnement, les matières premières et les produits finis. Diverses espèces ont été identifiées mais les espèces *S. equorum* et *S. succinus* étaient dominantes. Par contre, les espèces *S. carnosus* et *S. xylosus*, habituellement utilisées comme ferments pour les produits carnés, n'étaient isolées que sporadiquement des matières premières et de l'environnement, et jamais au niveau des produits finis. Des résultats comparables ont été obtenus lors de l'étude de 9 ateliers représentatifs de la diversité des salaisons traditionnelles du Massif Central, dans le cadre du projet européen « Tradisaufrage » mené au laboratoire.

Dans le cas du suivi des ferments *S. carnosus* et *S. xylosus* dans deux ateliers producteurs de salaisonsensemencées de type industriel et artisanal, nous avons pu observer que le ferment *S. xylosus* dominait la flore au niveau des produits finis alors que le ferment *S. carnosus* survivait au cours du procédé de fabrication. Aucun ferment n'a colonisé l'environnement de ces ateliers. Par contre, l'espèce *S. equorum* était présente dans leur environnement comme nous l'avons observé dans le cas d'ateliers traditionnels.

Ces différentes études ont montré que les espèces *S. carnosus* et *S. xylosus* sont peu isolées des salaisons traditionnelles françaises et de leur environnement. Ces espèces semblent peu compétitrices face à des espèces indigènes telles que *S. equorum* et *S. succinus*. Une grande diversité génétique des souches a été notée au sein de l'espèce *S. equorum* alors que les souches de *S. succinus* constituent un groupe assez homogène. Les espèces *S. equorum* et *S. succinus* semblent être bien adaptées à un environnement carné et il serait intéressant d'étudier l'influence de souches de *S. equorum* et *S. succinus* sur les qualités organoleptiques des saucissons. De part la capacité de ces deux espèces à survivre dans l'environnement, nous pouvons émettre l'hypothèse que des souches de *S. equorum* et de *S. succinus* seraient capables de former des biofilms, expliquant la colonisation des surfaces et des équipements. Ainsi il pourrait être intéressant de développer, pour les produits carnés, de nouveaux ferments à

partir de souches de *S. equorum* et *S. succinus*. Cependant, une toute récente étude fait état de l'isolement de souches de *S. equorum* et *S. succinus* à partir de prélèvements cliniques humains (Novakova *et al.*, 2006). Ceci souligne la difficulté de développer de nouveaux ferments et l'importance de prendre en compte la diversité des souches au sein des espèces.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

- Ah Tow, L. & Cowan, D.A.** (2003). Non-specificity of *Staphylococcus* generic primers. *Microbiology*. 149, 1605-1607.
- Ariznabarreta, A., Gonzalo, C. & San Primitivo, F.** (2002). Microbiological quality and somatic cell count of ewe milk with special reference to Staphylococci. *J. Dairy Sci.* 85, 1370-1375.
- Arkoudelos, J.S. & Nychas, G.J.E.** (1995). Comparative studies of the growth of *Staphylococcus carnosus* with or without glucose. *Lett Appl Microbiol.* 20, 19-24.
- Askar, A. & Treptow, H.** (1986). Biogenic amine. In *Lebensmitteln: vorkommen, bedeutung und bestimmung*. Eds Verlag Eugen Ulmer GmbH, 1-197.
- Ayhan, K. , Kolsarici, N. & Özkan, G.A.** (1999). The effects of starter culture on the formation of biogenic amines in Turkish soudjoucks. *Int J Food Microbiol.* 53, 183-188.
- Aymerich, T., Martin, B., Garriga, M. & Hugas, M.** (2003). Microbial quality and direct PCR identification of lactic acid bacteria and nonpathogenic staphylococci from artisanal low-acid sausages. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 4583-4594.
- Baird-Parker, A.C.** (1971). The grouping of staphylococci and micrococci. *J Clin Pathol.* 24, 769-770.
- Balaban, N. & Rasooly, A.** (2000). Staphylococcal enterotoxins. *Int J Food Microbiol.* 61, 1-10.
- Barbieri, G., Bolzoni, L., Parolari, G., Virgili, R., Buttini, R., Careri, M. & Mangia, A.** (1992). Flavor compounds of dry-cured ham. *J Agric Food Chem.* 40, 2389-2394.
- Barrière, C., Leroy-Setrin, S. & Talon, R.** (2001a). Characterization of catalase and superoxide dismutase in *Staphylococcus carnosus* 833 strain. *J Appl Microbiol.* 91, 514-519.
- Barrière, C., Bruckner, R. & Talon, R.** (2001b). Characterization of the single superoxide dismutase of *Staphylococcus xylosus*. *Appl Environ Microbiol.* 67, 4096-4104.

- Bascomb, S. & Manafi, M.** (1998). Use of enzyme tests in characterization and identification of aerobic and facultative anaerobic Gram-positive cocci. *Clin. Microbiol. Rev.* 11, 318-340.
- Bautista, L., Gaya, P., Medina, M. & Nunez, M.** (1988). A quantitative study of enterotoxin production by sheep milk staphylococci. *Appl Environ Microbiol.* 54, 566-569.
- Ben Hassen, S., Messadi, L. & Ben Hassen, A.** (2003). Identification et caractérisation des espèces de *Staphylococcus* isolées de lait de vaches atteintes ou non de mammite. *Ann Med Vet.* 147, 41-47.
- Berdagué, J.L., Monteil, P., Montel, M.C. & Talon, R.** (1993). Effects of starter cultures on the formation of flavour compounds in dry sausage. *Meat Sci.* 35, 275-287.
- Bjorland, J., Steinum, T., Kvitle, B., Waage, S., Sunde, M. & Heir, E.** (2005). Widespread distribution of disinfectant resistance genes among staphylococci of bovine and caprine origin in Norway. *J Clin Microbiol.* 43, 4363-4368.
- Blaiotta, G., Pennacchia, C., Ercolini, D., Moschetti, G. & Villani, F.** (2003a). Combining denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA V3 region and 16S-23S rDNA spacer region polymorphism analyses for the identification of staphylococci from Italian fermented sausages. *Syst Appl Microbiol.* 26, 423-433.
- Blaiotta, G., Pennacchia, C., Parente, E. & Villani, F.** (2003b). Design and evaluation of specific PCR primers for rapid and reliable identification of *Staphylococcus xylosus* strains isolated from dry fermented sausages. *Syst Appl Microbiol.* 26, 601-610.
- Blaiotta, G., Pennacchia, C., Villani, F., Ricciardi, A., Tofalo, R. & Parente, E.** (2004a). Diversity and dynamics of communities of coagulase-negative staphylococci in traditional fermented sausages. *J Appl Microbiol.* 97, 271-284.
- Blaiotta, G., Ercolini, D., Pennacchia, C., Fusco, V., Casaburi, A., Pepe, O. & Villani, F.** (2004b). PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus* spp. strains isolated from meat and dairy products. Evidence for new variants of seG and seI in *S. aureus* AB-8802. *J Appl Microbiol.* 97, 719-730.

- Blaiotta, G., Ercolini, D., Mauriello, G., Salzano, G. & Villani, F.** (2004c). Rapid and reliable identification of *Staphylococcus equorum* by a species-specific PCR assay targeting the *sodA* gene. *Syst Appl Microbiol.* 27, 696-702.
- Blaiotta, G., Casaburi, A. & Villani, F.** (2005). Identification and differentiation of *Staphylococcus carnosus* and *Staphylococcus simulans* by species-specific PCR assays of *sodA* genes. *Syst Appl Microbiol.* 28, 519-526.
- Bockelmann, W. & Hoppe-Seyler, T.** (2001). The surface flora of bacterial smear-ripened cheeses from cow's and goat's milk. *Int Dairy J.* 11, 307-314.
- Bover-Cid, S., Izquierdo-Pulido, M. & Vidal-Carou, M.C.** (1999). Effect of proteolytic starter cultures of *Staphylococcus* spp. on biogenic amine formation during the ripening of dry fermented sausages. *Int J Food Microbiol.* 46, 95-104.
- Bover-Cid, S., Izquierdo-Pulido, M. & Vidal-Carou, M.C.** (2000). Mixed starter cultures to control biogenic amine production in dry fermented sausages. *J Food Prot.* 63, 1556-1562.
- Bover-Cid, S., Miguelez-Arrizado, M.J., Latorre Moratalla, L.L. & Vidal-Carou, M.C.** (2006). Freezing of meat raw materials affects tyramine and diamine accumulation in spontaneously fermented sausages. *Meat Sci.* 72, 62-68.
- Brun, Y. & Bes, M.** (2000). *Staphylococcus*. In *Précis de bactériologie clinique*, Eds Freney J., Renaud F., Hansen W., Bollet C., ESKA. pp.783-830.
- Cáceres, P., Castillo, D. & Pizarro, M.** (1997). Secondary flora of Casar de Cáceres cheese: Characterization of *Micrococcaceae*. *Int Dairy J.* 7, 531-536.
- Casey, A.L., Worthington, T., Caddick, J.M., Hilton, A.C., Lambert, P.A. & Elliott, T.S.** (2005). RAPD for the typing of coagulase-negative staphylococci implicated in catheter-related bloodstream infection. *J Infect.* 52(4), 282-289.
- Chaves, F., Garcia-Alvarez, M., Sanz, F., Alba, C. & Otero, J.R.** (2005). Nosocomial spread of a *Staphylococcus hominis* subsp. *novobiosepticus* strain causing Sepsis in a neonatal intensive care unit. *J Clin Microbiol.* 43, 4877-4879.
- Chesneau, O., Morvan, A., Aubert, S. & El Solh, N.** (2000). The value of rRNA gene

restriction site polymorphism analysis for delineating taxa in the genus *Staphylococcus*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 50, 689-697.

Cocolin, L., Manzano, M., Cantoni, C. & Comi, G. (2001). Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the 16s *rrna* gene V1 region to monitor dynamic changes in the bacterial population during fermentation of italian sausages. *Appl Environ Microbiol.* 67, 5113-5121.

Cocolin, L., Rantsiou, K., Iacumin, L., Urso, R., Cantoni, C. & Comi, G. (2004). Study of the ecology of fresh sausages and characterization of populations of lactic acid bacteria by molecular methods. *Appl Environ Microbiol.* 70, 1883-1894.

Coppola, R., Iorizzo, M., Saotta, R., Sorrentino, E. & Grazia, L. (1997). Characterization of micrococci and staphylococci isolated from soppressata molisana, a Southern Italy fermented sausage. *Food Microbiol.* 14, 47-53.

Coppola, S., Mauriello, G., Aponte, M., Moschetti, G. & Villani, F. (2000). Microbial succession during ripening of Naples-type salami, a southern Italian fermented sausage. *Meat Sci.* 56, 321-329.

Corbière Morot-Bizot, S., Leroy, S. & Talon, R. (2006). Staphylococcal community of a small unit manufacturing traditional dry fermented sausages. *Int J Food Microbiol.* In Press.

Cordero, M.R. & Zumalacarregui, J.M. (2000). Characterization of *Micrococcaceae* isolated from salt used for Spanish dry-cured ham. *Lett Appl Microbiol.* 31, 303-306.

Couto, I., Pereira, S., Miragaia, M., Sanches, I.S. & de Lencastre, H. (2001). Identification of clinical staphylococcal isolates from humans by internal transcribed spacer PCR. *J Clin Microbiol.* 39, 3099-3103.

Couzinet, S., Jay, C., Barras, C., Vachon, R., Vernet, G., Ninet, B., Jan, I., Minazio, M.A., Francois, P., Lew, D. and others authors. (2005). High-density DNA probe arrays for identification of staphylococci to the species level. *J Microbiol Methods.* 61, 201-208.

Curtin, A.C., Gobbetti, M. & McSweeney, P.L.H. (2002). Peptidolytic, esterolytic and amino acid catabolic activities of selected bacterial strains from the surface of

smear cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 76, 231-240.

Dakic, I., Morrison, D., Vukovic, D., Savic, B., Shittu, A., Jezek, P., Hauschild, T. & Stepanovic, S. (2005). Isolation and molecular characterization of *Staphylococcus sciuri* in the hospital environment. *J. Clin. Microbiol.* 43, 2782-2785.

De Buyser, M.L., Morvan, A., Grimont, F. & el Solh, N. (1989). Characterization of *Staphylococcus* species by ribosomal RNA gene restriction patterns. *J Gen Microbiol.* 135, 989-999.

Deinhofer, M. & Pernthaner, A. (1995). *Staphylococcus* spp. as mastitis-related pathogens in goat milk. *Vet Microbiol.* 43, 161-166.

Delbes, C. & Montel, M.C. (2005). Design and application of a *Staphylococcus*-specific single strand conformation polymorphism-PCR analysis to monitor *Staphylococcus* populations diversity and dynamics during production of raw milk cheese. *Lett Appl Microbiol.* 41, 169-174.

Demeyer, D., Hoozee, J. & Mesdom, H. (1974). Specificity of lipolysis during dry sausage ripening. *J Food Sci.* 39, 293-296.

Devriese, L.A., Schleifer, K.H. & Adegoke, G.O. (1985). Identification of coagulase-negative staphylococci from farm animals. *J Appl Bacteriol.* 58, 45-55.

Di Maria, S., Basso, A.L., Santoro, E., Grazia, L. & Coppola, R. (2002). Monitoring of *Staphylococcus xylosus* DSM 20266 added as starter during fermentation and ripening of soppressata molisana, a typical Italian sausage. *J Appl Microbiol.* 92, 158-164.

Dinges, M.M., Orwin, P.M. & Schlievert, P.M. (2000). Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Rev.* 13, 16-34.

Dobbins, B.M., Kite, P., Kindon, A., McMahon, M.J. & Wilcox, M.H. (2005). DNA fingerprinting analysis of coagulase negative staphylococci implicated in catheter related bloodstream infections. *J Clin Pathol.* 55, 824-828.

Drancourt, M. & Raoult, D. (2002). *rpoB* gene sequence-based identification of *Staphylococcus* species. *J Clin Microbiol.* 40, 1333-1338.

- Drosinos, E.H., Mataragas, M., Xiraphi, N., Moschonas, G., Gaitis, F. & Metaxopoulos, J.** (2005). Characterization of the microbial flora from a traditional Greek fermented sausage. *Meat Sci.* 69, 307-317.
- Edwards, K.J., Kaufmann, M.E. & Saunders, N.A.** (2001). Rapid and Accurate Identification of Coagulase-Negative Staphylococci by Real-Time PCR. *J. Clin. Microbiol.* 39, 3047-3051.
- Engels, W.J.M. & Visser, S.** (1994). Isolation and comparative characterization of components that contribute to the flavor of different types of cheese. *Netherlands Milk and Dairy Journal.* 48, 127-140.
- Engelvin, G., Feron, G., Perrin, C., Molle, D. & Talon, R.** (2000). Identification of beta-oxidation and thioesterase activities in *Staphylococcus carnosus* 833 strain. *FEMS Microbiol Lett.* 190, 115-120.
- Ercolini, D., Hill, P.J. & Dodd, C.E.R.** (2003). Bacterial Community Structure and Location in Stilton Cheese. *Appl Environ Microbiol.* 69, 3540-3548.
- Euzeby, J.P.** (1997). List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet. *Int J Syst Bacteriol.* 47, 590-592.
- Fadda, S., Lebert, A., Leroy-Setrin, S. & Talon, R.** (2002). Decarboxylase activity involved in methyl ketone production by *Staphylococcus carnosus* 833, a strain used in sausage fermentation. *FEMS Microbiol Lett.* 210, 209-214.
- Fontana, C., Vignolo, G. & Cocconcelli, P.S.** (2005). PCR-DGGE analysis for the identification of microbial populations from Argentinean dry fermented sausages. *J Microbiol Methods.* 63(3), 254-63.
- Forsman, P., Tilsala-Timisjarvi, A. & Alatossava, T.** (1997). Identification of staphylococcal and streptococcal causes of bovine mastitis using 16S-23S rRNA spacer regions. *Microbiology.* 143, 3491-3500.
- Fox, P.F. & McSweeney, P.L.H.** (1996). Proteolysis in cheese during ripening. *Food Reviews International.* 12, 457-509.
- Frenay, J., Kloos, W.E., Hajek, V., Webster, J.A., Bes, M., Brun, Y. & Vernozzy-**

Rozand, C. (1999). Recommended minimal standards for description of new staphylococcal species. Subcommittee on the taxonomy of staphylococci and streptococci of the International Committee on Systematic Bacteriology. *Int J Syst Bacteriol.* 49(2), 489-502.

Fujita, S., Senda, Y., Iwagami, T. & Hashimoto, T. (2005). Rapid identification of staphylococcal strains from positive-testing blood culture bottles by internal transcribed spacer PCR followed by microchip gel electrophoresis. *J Clin Microbiol.* 43, 1149-1157.

Garcia, M.C., Otero, A., Garcia, M.L. & Moreno, B. (1987). Relationships between physico-chemical parameters and microbial groups in Manchego and Burgos cheeses studied by principal component analysis. *Microbiologia.* 3, 91-100.

Garcia-Varona, M., Santos, E.M., Jaime, I. & Rovira, J. (2000). Characterisation of *Micrococcaceae* isolated from different varieties of chorizo. *Int. J. Food Microbiol.* 54, 189-195.

Gardini, F., Tofalo, R. & Suzzi, G. (2003). A survey of antibiotic resistance in *Micrococcaceae* isolated from Italian dry fermented sausages. *J Food Prot.* 66, 937-945.

Gentilini, E., Denamiel, G., Betancor, A., Rebuelto, M., Rodriguez Fermepin, M. & De Torrest, R.A. (2002). Antimicrobial susceptibility of coagulase negative staphylococci isolated from bovine mastitis in Argentina. *J Dairy Sci.* 85, 1913-1917.

Giammarinaro, P., Leroy, S., Chacornac, J.-P., Delmas, J. & Talon, R. (2005). Development of a new oligonucleotide array to identify staphylococcal strains at species level. *J Clin Microbiol.* 43, 3673-3680.

Goh, S., Potter, S., Wood, J., Hemmingsen, S., Reynolds, R. & Chow, A. (1996). *hsp60* gene sequences as universal targets for microbial species identification: studies with coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol.* 34, 818-823.

Goh, S., Santucci, Z., Kloos, W., Faltyn, M., George, C., Driedger, D. & Hemmingsen, S. (1997). Identification of *Staphylococcus* species and subspecies by the chaperonin 60 gene identification method and reverse checkerboard hybridization. *J*

Clin Microbiol. 35, 3116-3121.

Gory, L., Millet, L., Godon, J.-J. & Montel, M.-C. (1999). Identification of *Staphylococcus carnosus* and *Staphylococcus warneri* isolated from meat by fluorescent *in situ* hybridization with 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Syst Appl Microbiol.* 22, 225-228.

Grimont, F. & Grimont, P.A. (1986). Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools. *Ann Inst Pasteur Microbiol.* 137B, 165-175.

Götz, F., Verheij, H.M. & Rosenstein, R. (1998). Staphylococcal lipases: molecular characterisation, secretion, and processing. *Chem Phys Lipids.* 93, 15-25.

Hajek, V. (1978). Identification of enterotoxigenic staphylococci from sheep and sheep cheese. *Appl Environ Microbiol.* 35, 264-268.

Hammes, W.P. & Hertel, C. (1998). New developments in meat starter cultures. *Meat Sci.* 49, S125-S138.

Hariharan, H., Donachie, W., Macaldowie, C. & Keefe, G. (2004). Bacteriology and somatic cell counts in milk samples from ewes on a scottish farm. *Can J Vet Res.* 68, 188-192.

Hauschild, T., Kehrenberg, C. & Schwarz, S. (2003). Tetracycline resistance in Staphylococci from free-living rodents and insectivores. *J Vet Med Series B.* 50, 443-446.

Heikens, E., FLeer, A., Paauw, A., Florijn, A. & Fluit, A.C. (2005). Comparaison of genotypic and phenotypic methods for species-level identification of clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol.* 43, 2286-2290.

Heir, E., Sundheim, G. & Holck, A.L. (1999). Identification and characterization of quaternary ammonium compound resistant staphylococci from the food industry. *Int J Food Microbiol.* 48, 211-219.

Hierro, E., de la Hoz, L. & Ordonez, J.A. (1997). Contribution of Microbial and Meat Endogenous Enzymes to the Lipolysis of Dry Fermented Sausages. *J Agric Food Chem.* 45, 2989-2995.

- Hinrichsen, L.L., Montel, M.C. & Talon, R.** (1994). Proteolytic and lipolytic activities of *Micrococcus roseus* (65), *Halomonas elongata* (16) and *Vibrio* sp. (168) isolated from Danish bacon curing brines. *Int J Food Microbiol.* 22, 115-126.
- Hookey, J.V., Richardson, J.F. & Cookson, B.D.** (1998). Molecular Typing of *Staphylococcus aureus* Based on PCR Restriction Fragment Length Polymorphism and DNA Sequence Analysis of the Coagulase Gene. *J. Clin. Microbiol.* 36, 1083-1089.
- Hoppe-Seyler, T.S., Jaeger, B., Bockelmann, W., Noordman, W.H., Geis, A. & Heller, K.J.** (2004). Molecular identification and differentiation of *Staphylococcus* species and strains of cheese origin. *Syst Appl Microbiol.* 27, 211-218.
- Hortensia Silla Santos, M.** (1998). Amino acid decarboxylase capability of microorganisms isolated in Spanish fermented meat products. *Int J Food Microbiol.* 39, 227-230.
- Igimi, S., Kawamura, S., Takahashi, E. and Mitsuoka, T.** (1989). *Staphylococcus felis*, a new species from clinical specimens from cats. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39, 373-377.
- Irlinger, F., Morvan, A., El Solh, N. & Bergere, J.L.** (1997). Taxonomic characterization of coagulase-negative staphylococci in ripening flora from traditional French cheeses. *Syst. Appl. Microbiol.* 20, 319-328.
- Kawano, J., Shimizu, A., Saitoh, Y., Yagi, M., Saito, T. & Okamoto, R.** (1996). Isolation of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from chickens. *J. Clin. Microbiol.* 34, 2072-2077.
- Kenneally, Leuschner & Arendt.** (1998). Evaluation of the lipolytic activity of starter cultures for meat fermentation purposes. *J Appl Microbiol.* 84, 839-846.
- Kloos, W.E. & Musselwhite, M.S.** (1975). Distribution and persistence of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species and other aerobic bacteria on human skin. *Appl Microbiol.* 30, 381-385.
- Kloos, W.E., Zimmerman, R.J. & Smith, R.F.** (1976). Preliminary studies on the characterization and distribution of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species on animal skin. *Appl Environ Microbiol.* 31, 53-59.

- Kloos, W.E.** (1980). Natural populations of the genus *Staphylococcus*. *Annu Rev Microbiol.* 34, 559-592.
- Kloos, W.E. & Wolfshohl, J.F.** (1982). Identification of *Staphylococcus* species with the API STAPH-IDENT system. *J Clin Microbiol.* 16, 509- 516.
- Kloos, W.E. & Schleifer, K.H.** (1986). Genus IV. *Staphylococcus*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Eds P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt, Williams & Wilkins. pp.1013-1035.
- Kloos, W.E. & Bannerman, T.L.** (1994). Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev.* 7, 117-140.
- Kloos, W., Ballard, D., George, C., Webster, J., Hubner, R., Ludwig, W., Schleifer, K., Fiedler, F. & Schubert, K.** (1998). Delimiting the genus *Staphylococcus* through description of *Macrococcus caseolyticus* gen. nov., comb. nov. and *Macrococcus equiperficus* sp. nov., and *Macrococcus bovicus* sp. no. and *Macrococcus carouselicus* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 48, 859-877.
- Krediet, T.G., Jones, M.E., Janssen, K., Gerards, L.J. & Fleer, A.** (2001). Prevalence of molecular types and *mecA* gene carriage of coagulase-negative staphylococci in a neonatal intensive care unit: relation to nosocomial septicemia. *J Clin Microbiol.* 39, 3376-3378.
- Kwok, A., Su, S., Reynolds, R.P., Bay, S., Av-Gay, Y., Dovichi, N. & Chow, A.** (1999). Species identification and phylogenetic relationships based on partial *hsp60* gene sequences within the genus *Staphylococcus*. *Int J Syst Bacteriol.* 49, 1181-1192.
- Kwok, A. & Chow, A.W.** (2003). Phylogenetic study of *Staphylococcus* and *Macrococcus* species based on partial *hsp60* gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol.* 53, 87-92.
- Lambert, L.H., Cox, T., Mitchell, K., Rossello-Mora, R.A., Del Cueto, C., Dodge, D.E., Orkand, P. & Cano, R.J.** (1998). *Staphylococcus succinus* sp. nov., isolated from Dominican amber. *Int J Syst Bacteriol.* 48(2), 511-518.
- Larrouture, C., Ardaillon, V., Pepin, M. & Montel, M.C.** (2000). Ability of meat starter cultures to catabolize leucine and evaluation of the degradation products by using

an HPLC method. *Food Microbiol.* 17, 563-570.

Longshaw, C.M., Farrell, A.M., Wright, J.D. & Holland, K.T. (2000). Identification of a second lipase gene, *gehD*, in *Staphylococcus epidermidis*: comparison of sequence with those of other staphylococcal lipases. *Microbiology.* 146, 1419-1427.

Ludwig, W., Schleifer, K.H., Fox, G.E., Seewaldt, E. & Stackebrandt, E. (1981). A phylogenetic analysis of staphylococci, *Peptococcus saccharolyticus* and *Micrococcus mucilaginosus*. *J Gen Microbiol.* 125, 357-366.

Marin, M.E., De La Rosa, M.C. & Cornejo, I. (1992). Enterotoxigenicity of *Staphylococcus* strains isolated from Spanish dry-cured hams. *Appl Environ Microbiol.* 58, 1067-1069.

Martineau, F., Picard, F., Roy, P., Ouellette, M. & Bergeron, M. (1996). Species-specific and ubiquitous DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus epidermidis*. *J Clin Microbiol.* 34, 2888-2893.

Martineau, F., Picard, F.J., Menard, C., Roy, P.H., Ouellette, M. & Bergeron, M.G. (2000). Development of a rapid PCR ASSAY SPECIFIC for *Staphylococcus saprophyticus* and application to direct detection from urine samples. *J Clin Microbiol.* 38, 3280-3284.

Martineau, F., Picard, F.J., Ke, D., Paradis, S., Roy, P.H., Ouellette, M. & Bergeron, M.G. (2001). Development of a PCR assay for identification of staphylococci at genus and species levels. *J. Clin. Microbiol.* 39, 2541-2547.

Martuscelli, M., Crudele, M.A., Gardini, F. & Suzzi, G. (2000). Biogenic amine formation and oxidation by *Staphylococcus xylosus* strains from artisanal fermented sausages. *Lett Appl Microbiol.* 31, 228-232.

Mason, W.J., Blevins, J.S., Beenken, K., Wibowo, N., Ojha, N. & Smeltzer, M.S. (2001). Multiplex PCR Protocol for the diagnosis of staphylococcal infection. *J Clin Microbiol.* 39, 3332-3338.

Masson, F., Hinrichsen, L.L., Talon, R. & Montel, M.C. (1999). Factors influencing leucine catabolism by a strain of *Staphylococcus carnosus*. *Int J Food Microbiol.* 49, 173-178.

- Mauriello, G., Moschetti, G., Villani, F., Blaiotta, G. & Coppola, S.** (2000). Antibiotic resistance of coagulase-negative staphylococci isolated from artisanal Naples-type salami. *Int J Food Sci Nutr.* 51, 19-24.
- Mauriello, G., Casaburi, A., Blaiotta, G. & Villani, F.** (2004). Isolation and technological properties of coagulase negative *staphylococci* from fermented sausages of Southern Italy. *Meat Sci.* 67, 149-158.
- Mendoza, M., Meugnier, H., Bes, M., Etienne, J. & Freney, J.** (1998). Identification of *Staphylococcus* species by 16S-23S rDNA intergenic spacer PCR analysis. *Int J Syst Bacteriol.* 48, 1049-1055.
- Meugnier, H., Bes, M., Vernozy-Rozand, C., Mazuy, C., Brun, Y., Freney, J. & Fleurette, J.** (1996). Identification and ribotyping of *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus equorum* strains isolated from goat milk and cheese. *Int J Food Microbiol.* 31, 325-331.
- Minor, T.E. & Marth, E.H.** (1976). Isolation and identification of staphylococci. In *Staphylococci and their significance in foods*. Eds Elsevier Scientific Publishing. 79-98.
- Miralles M. C., Flores J. & Perez-Martinez G.** (1996). Biochemical tests for the selection of *Staphylococcus* strains as potential meat starter cultures. *Food Microbiol.* 13, 227-236.
- Molimard, P. & Spinnler, H.E.** (1996). Review: compounds involved in the flavor of surface mold-ripened cheeses: origin and properties. *J Dairy Sci.* 79, 169-184.
- Molly, K., Demeyer, D., Johansson, G., Raemaekers, M., Ghistelinck, M. & Geenen, I.** (1997). The importance of meat enzymes in ripening and flavour generation in dry fermented sausages. First results of a European project. *Food Chem.* 59, 539-545.
- Montel, M.C., Talon, R., Cantonnet, M. & Fournaud, J.** (1992). Identification of *Staphylococcus* from French dry sausage. *Lett Appl Microbiol.* 15, 73-77.
- Montel, M.C., Talon, R., Berdagué, J.L. & Cantonnet, M.** (1993). Effects of starter cultures on the biochemical characteristics of french dry sausages. *Meat Sci.* 35, 229-240.

- Montel, M.C., Reitz, J., Talon, R., Berdague, J.L. & Rousset-Akrim, S. (1996).** Biochemical activities of *Micrococcaceae* and their effects on the aromatic profiles and odours of a dry sausage model. *Food Microbiol.* 13, 489-499.
- Montel, M.C., Masson, F. & Talon, R. (1999).** Comparison of biogenic amine content in traditional and industrial French dry sausages. *Sci Alim.* 19, 247-254.
- Morot-Bizot, S., Talon, R. & Leroy-Setrin, S. (2003).** Development of specific PCR primers for a rapid and accurate identification of *Staphylococcus xylosus*, a species used in food fermentation. *J Microbiol Methods.* 55, 279-286.
- Morot-Bizot, S.C., Talon, R. & Leroy, S. (2004).** Development of a multiplex PCR for the identification of *Staphylococcus* genus and four staphylococcal species isolated from food. *Journal of Applied Microbiology.* 97, 1087-1094.
- Mosbah, H., Sayari, A., Medjoub, H., Dhouib, H. & Gargouri, Y. (2005).** Biochemical and molecular characterization of *Staphylococcus xylosus* lipase. *Biochem Biophys Acta.* 1723, 282-291.
- Mounier, J., Gelsomino, R., Goerges, S., Vancanneyt, M., Vandemeulebroecke, K., Hoste, B., Scherer, S., Swings, J., Fitzgerald, G.F. & Cogan, T.M. (2005).** Surface microflora of four smear-ripened cheeses. *Appl Environ Microbiol.* 71, 6489-6500.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. & Erlich, H. (1986).** Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 51 Pt 1, 263-273.
- Muyzer, G., de Waal, E. & Uitterlinden, A. (1993).** Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol.* 59, 695-700.
- Nagase, N., Sasaki, A., Yamashita, K., Shimizu, A., Wakita, Y., Kitai, S. & Kawano, J. (2002).** Isolation and species distribution of staphylococci from animal and human skin. *J Vet Med Sci.* 64, 245-250.
- Neu, HC. (1992).** The crisis in antibiotic resistance. *Science.* 257, 1064-1073.
- Noll, W.W. & Collins, M. (1987).** Detection of Human DNA Polymorphisms with a

Simplified Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Technique. *PNAS*. 84, 3339-3343.

Novakova, D., Sedlacek, I., Pantucek, R., Stetina, V., Svec, P. & Petras, P. (2006). *Staphylococcus equorum* and *Staphylococcus succinus* isolated from human clinical specimens. *J Med Microbiol*. 55, 523-528.

Nychas, G.J.E. & Arkoudelos, J.S. (1990). Staphylococci: their role in fermented sausages. *J Applied Bacteriol. Symposium supplement*. 167-188.

Ogier, J.C., Lafarge, V., Girard, V., Rault, A., Maladen, V., Gruss, A., Leveau, J.Y. & Delacroix-Buchet, A. (2004). Molecular fingerprinting of dairy microbial ecosystems by use of temporal temperature and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol*. 70, 5628-5643.

Olsson, C., Ahrne, S., Pettersson, B. & Molin, G. (2003). The bacterial flora of fresh and chill-stored pork: analysis by cloning and sequencing of 16S rRNA genes. *Int J Food Microbiol*. 83, 245-252.

Onda, T., Yanagida, F., Tsuji, M., Shinohara, T. & Yokotsuka, K. (2003). Time series analysis of aerobic bacterial flora during Miso fermentation. *Lett Appl Microbiol*. 37, 162-168.

Papamanoli, E., Kotzekidou, P., Tzanetakis, N. & Litopoulou-Tzanetaki, E. (2002). Characterization of *Micrococcaceae* isolated from dry fermented sausage. *Food Microbiol*. 19, 441-449.

Parente, E., Martuscelli, M., Gardini, F., Grieco, S., Crudele, M.A. & Suzzi, G. (2001). Evolution of microbial populations and biogenic amine production in dry sausages produced in Southern Italy. *J Appl Microbiol*. 90, 882-891.

Paulsen, P. & Bauer, F. (1997). Biogenic amines in fermented sausages: 2. Factors influencing the formation of biogenic amines in fermented sausages. *Fleischwirtschaft Int*. 77, 32-34.

Pfaller, M.A. & Herwaldt, L.A. (1988). Laboratory, clinical and epidemiological aspects of coagulase negative staphylococci. *Clinical Microbiology Reviews*. 1, 281-299.

- Pinto, B., Chenoll, E. & Aznar, R.** (2005). Identification and typing of food-borne *Staphylococcus aureus* by PCR-based techniques. *Syst Appl Microbiol.* 28, 340-352.
- Place, R.B., Hiestand, D., Burri, S. & Teuber, M.** (2002). *Staphylococcus succinus* subsp. *casei* subsp. nov., a dominant isolate from a surface ripened cheese. *Syst Appl Microbiol.* 25, 353-359.
- Place, R.B., Hiestand, D., Gallman, H.R. & Teuber, M.** (2003a). *Staphylococcus equorum* subsp. *linens*, subsp. nov., a starter culture component for surface ripened semi-hard cheeses. *Syst Appl Microbiol.* 26, 30-37.
- Place, R. B., Imhof, M., Teuber, M. & Bosset, J.O.** (2003b). Distribution of the volatile (flavour) compounds in Raclette cheese produced with different staphylococci in the smear. *Mitt. Lebensm. Hyg.* 94, 192-211.
- Poyart, C., Quesne, G., Boumaila, C. & Trieu-Cuot, P.** (2001). Rapid and Accurate Species-Level Identification of Coagulase-Negative Staphylococci by Using the *sodA* Gene as a Target. *J. Clin. Microbiol.* 39, 4296-4301.
- Probst, A., Hertel, C., Richter, L., Wassill, L., Ludwig, W. & Hammes, W.** (1998). *Staphylococcus condimenti* sp. nov., from soy sauce mash, and *Staphylococcus carnosus* (Schleifer and Fischer 1982) subsp. *utilis* subsp. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 48, 651-658.
- Pulverer, G., Peters, G. & Schumacher-Perdreau, F.** (1987). Coagulase-negative staphylococci. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [A]*. 264, 1-28.
- Rantsiou, K., Urso, R., Iacumin, L., Cantoni, C., Cattaneo, P., Comi, G. & Cocolin, L.** (2005a). Culture-dependant and independant methods to investigate the microbial ecology of Italian fermented sausages. *Appl Environ Microbiol.* 71, 1977-1986.
- Rantsiou, K., Iacumin, L., Cantoni, C., Comi, G. & Cocolin, L.** (2005b). Ecology and characterization by molecular methods of *Staphylococcus* species isolated from fresh sausages. *Int J Food Microbiol.* 97, 277-284.
- Raponi, G., Ghezzi, MC., Gherardi, G., Dicuonzo, G., Caputo, D., Venditti, M., Rocco, M., Micozzi, A. & Mancini, C.** (2005). Antimicrobial susceptibility, biochemical and genetic profiles of *Staphylococcus haemolyticus* strains isolated from

bloodstream of patients hospitalized in critical care unit. *J Chemother* . 17, 264-269.

Rather, P.N., Davis, A.P. & Wilkinson, B.J. (1986). Slime production by bovine milk *Staphylococcus aureus* and identification of coagulase negative staphylococcal isolates. *J Clin Microbiol* . 23, 858-862.

Reps, A. (1993). Bacterial surface ripened-cheese. In *Cheese-chemistry, Physics and Microbiology*, Eds Fox P. F., Chapman & Hall, London, vol.2, 137-172.

Rebecchi, A., Crivori, S., Sarra, P.G. & Cocconcelli, P.S. (1998). Physiological and molecular techniques for the study of bacterial community development in sausage fermentation. *J. Appl. Microbiol.* 84, 1043-1049.

Rodriguez, M., Nunez, F., Cordoba, J., Sanabria, C., Bermudez, E. & Asensio, M.A. (1994). Characterization of *Staphylococcus* spp. and *Micrococcus* spp. isolated from Iberian ham throughout the ripening process. *Int J Food Microbiol.* 24, 329-335.

Rodriguez, M., Nunez, F., Cordoba, J., Bermudez, E. & Asensio, M. (1996). Gram-positive, catalase-positive cocci from dry cured Iberian ham and their enterotoxigenic potential. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1897-1902.

Rosec, J.P., Guiraud, J.P., Dalet, C. & Richard, N. (1997). Enterotoxin production by staphylococci isolated from foods in France. *Int J Food Microbiol.* 35, 213-221.

Rosec, J.P. & Gigaud, O. (2002). Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France. *Int J Food Microbiol.* 77, 61-70.

Rosenstein, R. & Götz, F. (2000). Staphylococcal lipases: biochemical and molecular characterization. *Biochimie.* 82, 1005-1014.

Rossi, F., Tofalo, R., Torriani, S. & Suzzi, G. (2001). Identification by 16S-23S rDNA intergenic region amplification, genotypic and phenotypic clustering of *Staphylococcus xylosus* strains from dry sausages. *J Appl Microbiol.* 90, 365-371.

Samelis, J., Metaxopoulos, J., Vlassi, M. & Pappa, A. (1998). Stability and safety of traditional Greek salami -- a microbiological ecology study. *Int J Food Microbiol.* 44, 69-82.

Schleifer, K.H. & Kloos, W.E. (1975). A simple test system for the separation of

staphylococci from micrococci. *J Clin Microbiol.* 1, 337-338.

Schleifer, K.H. & Fischer, U. (1982). Description of a new species of the genus *Staphylococcus*: *Staphylococcus carnosus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 32, 153-156.

Schwartz, D.C. & Cantor, C.R. (1984). Separation of yeast chromosome-sized DNA by pulse field gradient gel electrophoresis. *Cell.* 37, 67-75.

Schwartz, S. & Noble, W.C. (1994). Tetracycline resistance genes in staphylococci from the skin of pigs. *J Appl Bacteriol.* 76, 320-326.

Shale, K., Lues, J.F.R., Venter, P. & Buys, E.M. (2005). The distribution of *Staphylococcus* sp. on bovine meat from abattoir deboning rooms. *Food Microbiol.* 22, 433-438.

Skow, A., Mangold, K.A., Tajuddin, M., Huntington, A., Fritz, B., Thomson, R.B.Jr. & Kaul, K.L. (2005). Species-Level Identification of Staphylococcal Isolates by Real-Time PCR and Melt Curve Analysis. *J. Clin. Microbiol.* 43, 2876-2880.

Snopkova, S., Götz, F., Doskar, J. & Rosypal, S. (1994). Pulse-field gel electrophoresis of the genomic restriction fragments of coagulase-negative staphylococci. *FEMS Microbiol. Lett.* 124, 131-140.

Sondergaard, A.K. & Stahnke, L.H. (2002). Growth and aroma production by *Staphylococcus xylosus*, *S. carnosus* and *S. equorum*--a comparative study in model systems. *Int J Food Microbiol.* 75, 99-109.

Spare, M.K., Tebbs, S.E., Lang, S., Lambert, P.A., Worthington, T., Lipkin, G.W. & Elliott, T.S. (2003). Genotypic and phenotypic properties of coagulase-negative staphylococci causing dialysis catheter-related sepsis. *J Hosp Infect.* 54, 272-278.

Spergser, J., Wieser, M., Taubel, M., Rossello-Mora, R.A., Rosengarten, R. & Busse, H.J. (2003). *Staphylococcus nepalensis* sp. nov., isolated from goats of the Himalayan region. *Int J Syst Evol Microbiol.* 53, 2007-2011.

Stahnke, L.H. (1995). Dried sausages fermented with *Staphylococcus xylosus* at different temperatures and with different ingredient levels — Part II. Volatile components. *Meat Sci.* 41, 193-209.

- Stuhlmeier, R. & Stuhlmeier, K.M. (2003).** Fast, simultaneous, and sensitive detection of staphylococci. *J Clin Pathol.* 56, 782-785.
- Suzzi, G. & Gardini, F. (2003).** Biogenic amines in dry fermented sausages: a review. *Int J Food Microbiol.* 88, 41-54.
- Svec, P., Vancanneyt, M., Sedlacek, I., Engelbeen, K., Stetina, V., Swings, J. & Petras, P. (2004).** Reclassification of *Staphylococcus pulvereri* Zakrzewska-Czerwinska *et al.* 1995 as a later synonym of *Staphylococcus vitulinus* Webster *et al.* 1994. *Int J Syst Evol Microbiol.* 54, 2213-2215.
- Takahashi, T., Kaneko, M., Mori, Y., Tsuji, M., Kikuchi, N. & Hiramune, T. (1997).** Phylogenetic analyses of *Staphylococcus* based on the 16S rDNA sequence and assignment of clinical isolates from animals. *J Vet Med Sci.* 59, 775-783.
- Talon, R., Montel, M.C., Gandemer, G., Viau, M. & Cantonnet, M. (1993).** Lipolysis of pork fat by *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus saprophyticus* and *Micrococcus varians*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 38, 606-609.
- Talon, R., Dublet, N., Montel, M.C. & Cantonnet, M. (1995).** Purification and characterization of extracellular *Staphylococcus warneri* lipase. *Cur Microbiol.* 30, 11-16.
- Talon, R., Chastagnac, C., Vergnaiss L., Montel, M.C. & Berdague, J.L. (1998).** Production of esters by Staphylococci. *Int J Food Microbiol.* 45, 143-150.
- Talon, R., Walter, D., Chartier, S., Barriere, C. & Montel, M.C. (1999).** Effect of nitrate and incubation conditions on the production of catalase and nitrate reductase by staphylococci. *Int J Food Microbiol.* 52, 47-56.
- Talon, R., Walter, D. & Montel, M.C. (2000).** Growth and effect of Staphylococci and lactic acid bacteria on unsaturated free fatty acids. *Meat Sci.* 54, 41-47.
- Talon, R., Leroy-Sétrin, S. & Fadda, S. (2002).** Bacterial starters involved in the quality of fermented meat products. In *Research Advances in Quality of Meat and Meat Products*, Eds Fidel Toldrá, Research Signpost, 175-191.
- Talon, R., Leroy-Sétrin, S. & Fadda, S. (2004).** Dry fermented sausages. In *Handbook*

of *Food and Beverage Fermentation Technology*, Marcel Dekker Inc., New York, 397-416.

Tanasupawat, S., Hashimoto, Y., Ezaki, T., Kozaki, M. & Komagata, K. (1992). *Staphylococcus piscifermentans* sp. nov., from fermented fish in Thailand. *Int J Syst Bacteriol.* 42, 577-581.

Tenover, F., Arbeit, R., Goering, R., Mickelsen, P., Murray, B., Persing, D. & Swaminathan, B. (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 33, 2233-2239.

Trulzsch, K., Rinder, H., Trcek, J., Bader, L., Wilhelm, U. & Heesemann, J. (2002). "*Staphylococcus pettenkoferi*," a novel staphylococcal species isolated from clinical specimens. *Diag Microbiol Infect Dis.* 43, 175-182.

Valle, J., Gomez-Lucia, E., Piriz, S., Goyache, J., Orden, J.A. & Vadillo, S. (1990). Enterotoxin production by staphylococci isolated from healthy goats. *Applied and environmental microbiology.* 56, 1323-1326.

Vernozy-Rozand, C., Mazuy, C., Prevost, G., Lapeyre, C., Bes, M., Brun, Y. & Fleurette, J. (1996). Enterotoxin production by coagulase-negative staphylococci isolated from goats' milk and cheese. *Int J Food Microbiol.* 30, 271-280.

Vernozy-Rozand, C., Mazuy, C., Meugnier, H., Bes, M., Lasne, Y., Fiedler, F., Etienne, J. & Freney, J. (2000). *Staphylococcus fleurettii* sp. nov., isolated from goat's milk cheeses. *Int J Syst Evol Microbiol.* 50(4), 1521-1527.

Vilar, I., Garcia Fontan, M.C., Prieto, B., Tornadijo, M.E. & Carballo, J. (2000). A survey on the microbiological changes during the manufacture of dry-cured lacón, a Spanish traditional meat product. *J Appl Microbiol.* 89, 1018-1026.

Villard, L., Kodjo, A., Borges, E., Maurin, F. & Richard, Y. (2000). Ribotyping and rapid identification of *Staphylococcus xylosus* by 16-23S spacer amplification. *FEMS Microbiol. Lett.* 185, 83-87.

Warthesen, J.J., Scanlan, R.A., Bills, D.D. & Libbey, L.M. (1975). Formation of heterocyclic N-nitrosamines from the reaction of nitrite and selected primary diamines

and amino acids. *J Agric Food Chem.* 23, 898-902.

Webster, J., Bannerman, T., Hubner, R., Ballard, D., Cole, E., Bruce, J., Fiedler, F., Schubert, K. & Kloos, W. (1994). Identification of the *Staphylococcus sciuri* species group with EcoRI fragments containing rRNA sequences and description of *Staphylococcus vitulus* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 44, 454-460.

Welsh, J. & McClelland, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 18, 7213-7218.

Widjojoatmodjo, M., Fluit, A. & Verhoef, J. (1995). Molecular identification of bacteria by fluorescence-based PCR-single- strand conformation polymorphism analysis of the 16S rRNA gene. *J. Clin. Microbiol.* 33, 2601-2606.

Wieser, M. & Busse, H.J. (2000). Rapid identification of *Staphylococcus epidermidis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50, 1087-1093.

Williams, J.G., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. & Tingey, S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18, 6531-6535.

Yugueros, J., Temprano, A., Sanchez, M., Luengo, J.M. & Naharro, G. (2001). Identification of *Staphylococcus* spp. by PCR-restriction fragment length polymorphism of *gap* gene. *J. Clin. Microbiol.* 39, 3693-3695.

TRAVAUX SCIENTIFIQUES

COMMUNICATIONS AFFICHEES

Morot-Bizot, S., Leroy-Setrin, S. and Talon, R. Identification of *Staphylococcus* species isolated from a traditional workshop. 48ème congrès international des sciences et technologies de la viande (ICOMST), Rome, Italie, 29-31 juillet 2002.

Morot-Bizot, S., Leroy-Setrin, S. and Talon, R. Ecosystèmes des ateliers producteurs de salaisons traditionnelles. Rencontres des Microbiologistes de l'INRA. Dourdan, 5-7 mai 2003.

Morot-Bizot, S., Leroy-Setrin, S. and Talon, R. Ecosystèmes des ateliers producteurs de salaisons traditionnelles : les staphylocoques. 12^{ème} réunion du Club des Bactéries Lactiques, Aurillac, 19-21 mai 2003.

Morot-Bizot, S., Leroy-Setrin, S. and Talon, R. Identification des staphylocoques isolés d'un atelier fermier de salaison. 2^{ème} colloque Micro-organismes et Environnement, Rennes, 9 et 10 décembre 2003.

Morot-Bizot, S., Leroy-Setrin, S. and Talon, R. Evaluation de la diversité des staphylocoques dans un atelier fermier de salaison. 6ème congrès de la Société Française de Microbiologie (SFM), Bordeaux, 10-12 mai 2004.

COMMUNICATION ORALE

Corbière Morot-Bizot S. « Ecologie des ateliers fermiers de salaison : étude de la flore staphylococcique par des méthodes moléculaires ». Colloque des Produits Alimentaires Fermiers, ENITA, Clermont-ferrand, 6 et 7 octobre 2004.



IDENTIFICATION OF *STAPHYLOCOCCUS* SPECIES ISOLATED FROM A TRADITIONAL WORKSHOP

S. MOROT-BIZOT, S. LEROY-SETRIN, R. TALON - SRV Microbiologie, INRA, Centre Clermont-Theix, F-63122 Saint-Genès Champanelle

Objectives

“Traditional” fermented dry sausages rely on natural house flora contamination, specific to each workshop and composed of useful microorganisms, but also spoilage and pathogenic flora. Few sporadic studies on traditional meat products have shown that hygienic shortcomings can lead up to 25% of product loss. One way to improve safety of traditional dry sausages while preserving their typical sensory quality is to develop specific starters for each producer. This study has been carried out to identify the staphylococci contaminating the entire workshop and the products in order to select starters well adapted to the process.

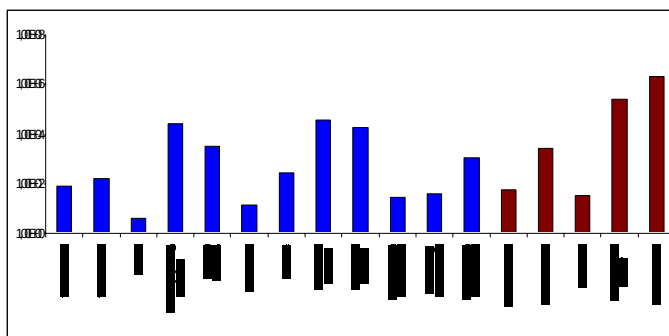
Methods

Strains: 37 staphylococci strains isolated from a traditional curing workshop and 32 reference strains of coagulase-negative staphylococci (CNS) were studied.

Phenotypic method: strains of staphylococci were identified by using API Staph strips (Bio Mérieux).

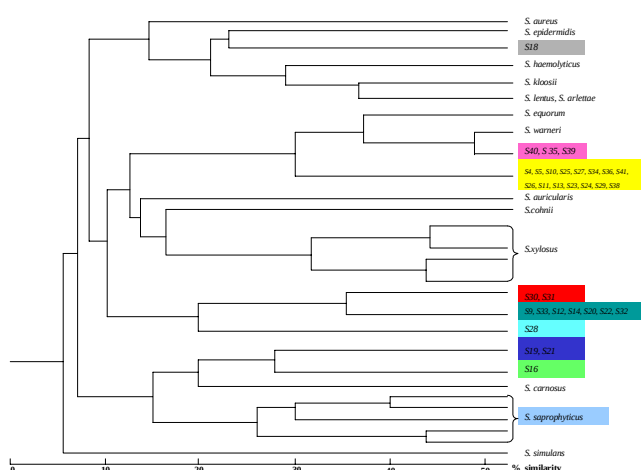
Results

Repartition of staphylococci in the workshop and the products



■ material and surfaces of workshop (CFU/cm²) ■ raw products (CFU/g)

The highest contamination was found in the chopping block, the cold and drying rooms, and the stuffing machine. In raw material, staphylococci multiplied during the process and reached in the finished product, levels found in industrial inoculated sausages.



Conclusion

It is not possible to identify strains of staphylococci isolated from curing environments by using only API Staph strips. So it is necessary to develop molecular tools such primers or probes that will allow rapid and specific identification.

Molecular methods : the oligonucleotide probes CARNO 440, WAR 180 and SAPRO 157, specific for *S. carnosus*, *S. warneri* and *S. saprophyticus* respectively, were used for dot blot hybridisation. For RAPD assays, the three different primers SLH13, PH2 and PH5 were used.

Identification of strains by phenotypic and genotypic methods

STRAINS	API STRIPS	PROBES		RAPD-TYPES WITH PRIMER PH5
		WAR 180	SAPRO 157	
S1, S2, S3, S6	<i>S. saprophyticus</i>	-	+	P0
S15	<i>S. saprophyticus</i>	-	+	P6
S4, S5, S10, S25, S27, S34, S36, S41	<i>S. xylosus</i>	-	-	P1
S26, S40	<i>S. lentus</i>	-	-	P1
S11, S13, S23, S24, S29, S38, S35, S39	<i>S. sciuri</i>	-	-	P1
S28	<i>S. epidermidis</i>	-	-	P2
S19, S21	<i>S. xylosus</i>	-	-	P3
S16	<i>S. xylosus</i>	+	-	P4
S18	<i>S. xylosus</i>	-	-	P5
S9, S33	<i>S. xylosus</i>	-	-	P7
S12, S14, S20	<i>S. xylosus</i>	+	-	P7
S22	<i>S. hominis</i>	+	-	P7
S30, S31	<i>S. xylosus</i>	+	-	P8
S32	<i>S. xylosus</i>	+	-	P9

On the 37 strains isolated, 20 were identified to *S. xylosus*, 8 to *S. sciuri*, 5 to *S. saprophyticus*, 2 to *S. lentus*, 1 to *S. hominis* and 1 to *S. epidermidis* by API Staph strips.

By dot-blot hybridisations, the probe CARNO 440 confirmed the absence of the *S. carnosus* species in the workshop; the WAR 180 probe was found to cross-hybridise with some non-warneri species; finally, the SAPRO 157 probe was the most specific one and hybridised with all the strains identified as *S. saprophyticus* by the API Staph strips. RAPD-types with the primer PH5, which was the most interesting one, had allowed us to establish 9 profiles (P1-P9), but no amplification was obtained with some *S. saprophyticus* species.

Phylogenetic tree based on the RAPD-types obtained with the primers PH2, PH5 and SLH13

Dendrogram showed that most of the strains isolated from the workshop cannot be clearly identified. Nevertheless, some strains belonging to *S. saprophyticus* species were well-distinguished with API strips, dot-blot and RAPD techniques.



DEVELOPPEMENT D'AMORCES SPECIFIQUES DE L'ESPECE *STAPHYLOCOCCUS XYLOSUS*, UTILISEE COMME FERMENT DANS LES PRODUITS CARNES

S. MOROT-BIZOT, R. TALON, S. LEROY-SETRIN- SRV Microbiologie, INRA, Centre Clermont-Theix, F-63122 Saint-Genès Champanelle

Objectifs

Staphylococcus xylosus est l'espèce de staphylocoque la plus fréquemment isolée de produits carnés naturellement fermentés tel que le saucisson sec. Cette espèce, impliquée dans la formation de la couleur et dans le développement de la flaveur, est de ce fait utilisée comme ferment.

Mais l'espèce *S. xylosus* est difficile à identifier avec les seules méthodes phénotypiques. Aussi, nous avons cherché à développer un outil fiable pour son identification.

Conclusion

Nous avons développé des amorces spécifiques qui permettent une identification rapide et sans ambiguïté de l'espèce *S. xylosus*.

Ces amorces seront très utiles pour l'identification de cette espèce qui est très répandue dans les ateliers de salaisons.

Méthodes

Souches bactériennes: 27 souches de *Staphylococcus* isolées des surfaces, des matières premières et des produits finis d'un atelier fermier producteur de salaisons ont été étudiées. Pour comparaison, 20 souches de staphylocoques à coagulase négative de référence ont été utilisées.

Méthodes phénotypiques: Les souches d'atelier ont été tout d'abord identifiées par des galeries API-Staph (Bio Mérieux).

Méthodes génotypiques: Nous avons comparé les souches d'atelier et de référence par PFGE (électrophorèse en champ pulsé) avec les enzymes de restriction *Apal* et *SmaI*. Pour la RAPD (amplification au hasard de zones d'ADN répétées), nous avons utilisé l'amorce 5 décrite par Wieser et Busse (2000). Enfin, les amorces XYL F et XYL R (Morot-Bizot *et al.*, 2003) synthétisées à partir du produit RAPD de 539 pb, ont été testées par PCR sur toutes les souches de staphylocoques.

Résultats

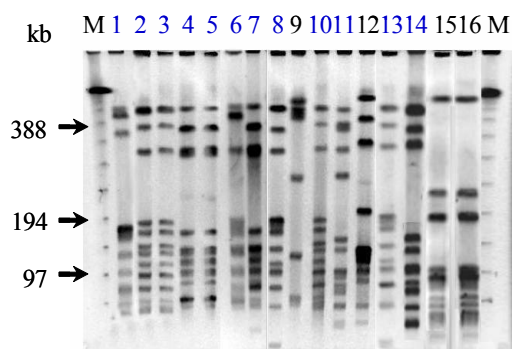


Fig. 1. Profils PFGE des souches de *Staphylococcus* avec l'enzyme *Apal*.

M: marqueur de taille Lambda (Bio-Rad); 1- 8 et 10: souches de *S. xylosus* de référence; 9, 11-16: souches de *Staphylococcus* isolées de l'atelier. Les chiffres en bleu correspondent aux souches appartenant à l'espèce *S. xylosus*.

Les 27 souches ont été identifiées comme appartenant à l'espèce *S. xylosus* par les galeries API-Staph. Mais par PFGE, en comparant les profils des isolats obtenus avec ceux de 12 souches de *S. xylosus* utilisées comme référence, seulement 7 des 27 isolats sont effectivement liés à cette espèce, selon les critères d'interprétation de Tenover *et al.* (1995).

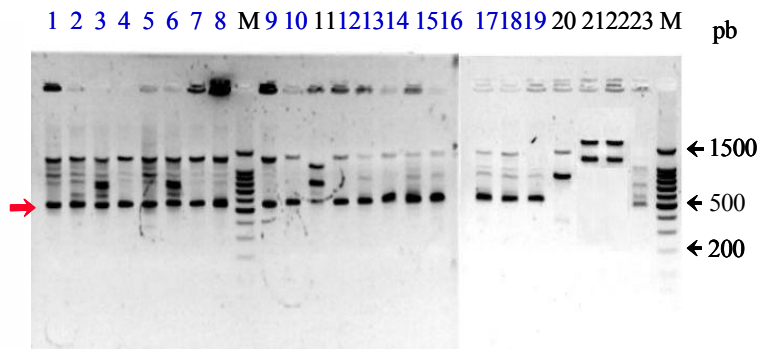


Fig. 2. RAPD-types des souches de *Staphylococcus* obtenus avec l'amorce 5.

M: marqueur de taille 100-pb (Promega); 1-10 et 12-13: souches de *S. xylosus* de référence; 11, 14-23: souches de *Staphylococcus* isolées de l'atelier.

Le fragment de 539-pb commun aux souches de *S. xylosus* est indiqué par une flèche rouge sur la photo.

L'amorce 5 nous a permis de mettre en évidence un produit de 539 pb commun à toutes les souches de *S. xylosus*. Une paire d'amorces nommées XYL F et XYL R ont été déterminées à partir de la séquence de ce fragment.

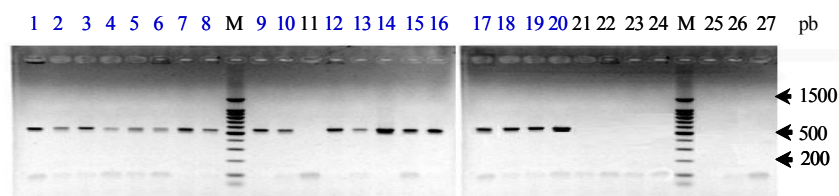


Fig. 3. Amplification par PCR avec les amorces spécifiques XYL F et XYL R.

M: marqueur de taille 100-pb (Promega); 1-10, 12-13: souches de *S. xylosus* de référence; 11, 14-23: souches de *Staphylococcus* isolées de l'atelier; 24: *S. carnosus*; 25: *S. saprophyticus*; 26: *S. sciuri*; 27: *S. hominis*.

Les amorces XYL F et XYL R sont spécifiques de l'espèce *S. xylosus* lors des essais par PCR sur 20 espèces différentes de *Staphylococcus*. De plus, elles confirment l'identification des 7 isolats caractérisés par PFGE comme appartenant à cette espèce.



Institut National de la Recherche Agronomique

Stéphanie Morot-Bizot
Sabine Leroy-Sétrin
Régine Talon
SRV - Microbiologie
INRA-Theix
63122 Saint-Genès Champanelle, France
email: smorot@clermont.inra.fr

Conclusion

- Les espèces *S. xylosus* et *S. saprophyticus* décrites comme colonisant les ateliers de salaison ont été peu isolées: elles représentent respectivement 2 % et 11 % des isolats de cet atelier.
- Deux espèces peu décrites dans les salaisons colonisent majoritairement cet atelier, des matières premières au produit fini ainsi que les surfaces: *S. gallinarum* et *S. equorum*.

Identification des staphylocoques isolés d'un atelier fermier de salaison

Objectif

Les salaisons traditionnelles sont des produits carnés crus, fermentés et caractérisés par l'absence d'ajout de ferments. Ceci implique que la fabrication est tributaire de la flore présente dans les matières premières et l'environnement des ateliers, notamment des staphylocoques.

L'identification des staphylocoques qui colonisent ces ateliers est cruciale car certaines espèces sont pathogènes ou pathogènes opportunistes et d'autres ont un intérêt technologique. Les espèces *Staphylococcus xylosus* et *Staphylococcus saprophyticus* sont les plus fréquemment isolées de ces environnements. Mais leur identification se base le plus souvent sur des tests biochimiques qui s'avèrent être insuffisants. C'est pourquoi il est indispensable d'utiliser des méthodes moléculaires pour identifier les staphylocoques isolés de l'environnement.

Méthodes

Souches: 178 souches de cocci à gram positif ont été isolées d'un atelier de salaison.

PCR multiplex: en combinant les amorces spécifiques du genre *Staphylococcus* TstaG422/Tstag765 et des espèces *S. epidermidis* Se705-1/Se705-2 ; *S. aureus* Sa442-1/Sa442-2 ; *S. saprophyticus* (Martineau *et al.* 2001, 1996, 1998, 2000) et *S. xylosus* XYL F/XYL R (Morot-Bizot *et al.*, 2003).

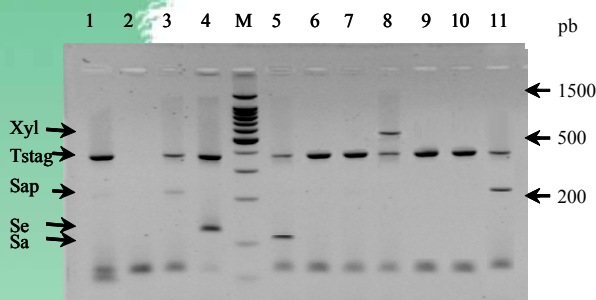
PFGE: l'analyse par électrophorèse en champ pulsé a été réalisée après digestion des ADN par l'enzyme *SmaI*.

Séquençage du gène codant la superoxyde dismutase A (*sodA*): des souches ont été caractérisées par la séquence du gène *sodA* et identifiées par comparaison avec la base de données établie par Poyart *et al.* (2001).

Résultats

PCR multiplex

- 151 *Staphylococcus spp* ; 19 *S. saprophyticus* +
- 3 *S. xylosus* + ; 2 *S. aureus* + ; 3 *S. epidermidis* +

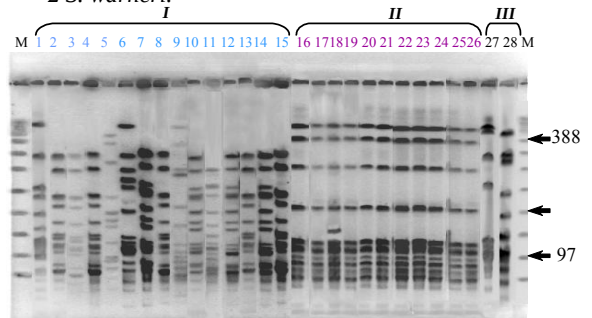


1=*S. sciuri*, 2=*Kocuria varians*, 3=*S. saprophyticus*, 4=*S. epidermidis*, 5=*S. aureus*, 8=*S. xylosus*, 11=*S. saprophyticus*, 6, 7, 9, 10 isolats de l'atelier

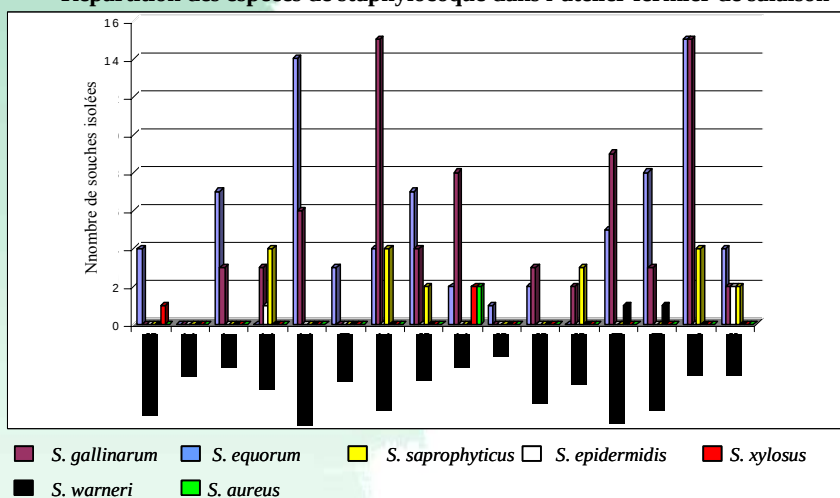
Avec la PCR multiplex, 25 souches sur 178 ont pu être identifiées, mais 151 souches de *Staphylococcus* n'ont pas été identifiées au niveau de l'espèce. Ces 151 souches ont été analysées par PFGE.

Identification par PFGE et séquençage *sodA*

- sur 151 souches: 76 *S. equorum* ; 73 *S. gallinarum* ; 2 *S. warneri*.



Répartition des espèces de staphylocoque dans l'atelier fermier de salaison



Les espèces *S. gallinarum* et *S. equorum* dominent et colonisent cet atelier. En effet, 43 % des souches étudiées appartiennent à l'espèce *S. equorum* et 42 % à l'espèce *S. gallinarum*. L'espèce *S. xylosus* habituellement isolée et identifiée dans les produits carnés crus fermentés est ici retrouvée de façon minoritaire (2 %) contrairement à ce qui est décrit dans la littérature.

L'espèce *S. saprophyticus* colonise essentiellement les surfaces et ne représente que 11 % des souches identifiées.

Enfin, d'autres espèces ont été isolées de façon sporadique; il s'agit des espèces *S. aureus* (isolée au niveau de la mèche), *S. warneri* (au niveau du saucisson après 1 semaine de séchage et du saucisson fini) et *S. epidermidis* (au niveau de la carcasse et de la table de découpe A).

MARTINEAU *et al.* 1996. J. Clin. Microbiol. 34, 2888-2893; MARTINEAU *et al.* 1998. J. Clin. Microbiol. 36, 618-623; MARTINEAU *et al.* 2000. J. Clin. Microbiol. 38, 3280-3284; MARTINEAU *et al.* 2001. J. Clin. Microbiol. 39, 2545-2547; MOROT-BIZOT *et al.* 2003. J. Microbiol. Meth. 55, 279-286. POYART *et al.* 2001. J. Clin. Microbiol. 39, 4296-4301.

EVALUATION DE LA DIVERSITE DES STAPHYLOCOQUES DANS UN ATELIER FERMIER DE SALAISSON

Stéphanie Morot-Bizot, Sabine Leroy-Sétrin, Régine Talon; INRA- Centre Clermont-Ferrand-Theix, Unité de Recherches sur la Viande – équipe Microbiologie, 63122 Saint-Genès Champanelle, France. email: smorot@clermont.inra.fr. Projet européen Tradisausage-QLK1-CT2002-02240



Objectif

Les salaisons traditionnelles sont des produits carnés crus et naturellement fermentés. La fabrication est tributaire de la flore présente dans les matières premières et l'environnement des ateliers, notamment des staphylocoques. L'identification des staphylocoques qui colonisent ces ateliers est cruciale car certaines espèces sont pathogènes ou pathogènes opportunistes et d'autres ont un intérêt technologique. Les espèces *Staphylococcus xylosus* et *S. saprophyticus* sont les plus fréquemment isolées de ces environnements. Mais leur identification se base le plus souvent sur des tests biochimiques qui s'avèrent être insuffisants. Il est indispensable d'utiliser des méthodes moléculaires pour identifier les staphylocoques isolés de l'environnement.

Méthodes

Souches: 374 souches de cocci à Gram positif isolées d'un atelier de salaison.

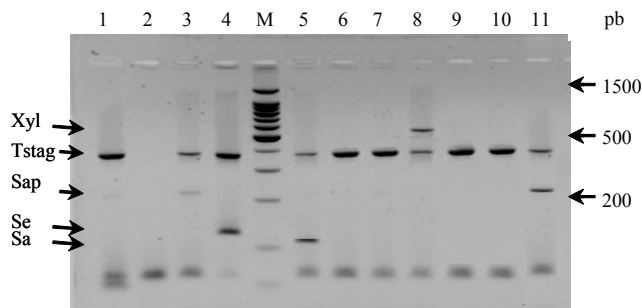
PCR multiplex: Combinaison d'amorces spécifiques du genre *Staphylococcus* TstaG422/Tstag765 et des espèces *S. saprophyticus* Sap1/Sap2; *S. aureus* Sa442-1/Sa442-2; *S. epidermidis* Se705-1/Se705-2 (Martineau et al. 2001, 2000, 1998, 1996) et *S. xylosus* XYL F/XYL R (Morot-Bizot et al., 2003).

PFGE: Analyse par électrophorèse en champs pulsés après digestion des ADN par l'enzyme *SmaI*.

Séquençage du gène codant la superoxyde dismutase A (*sodA*): Comparaison avec la base de données établie par Poyart et al. (2001).

Résultats

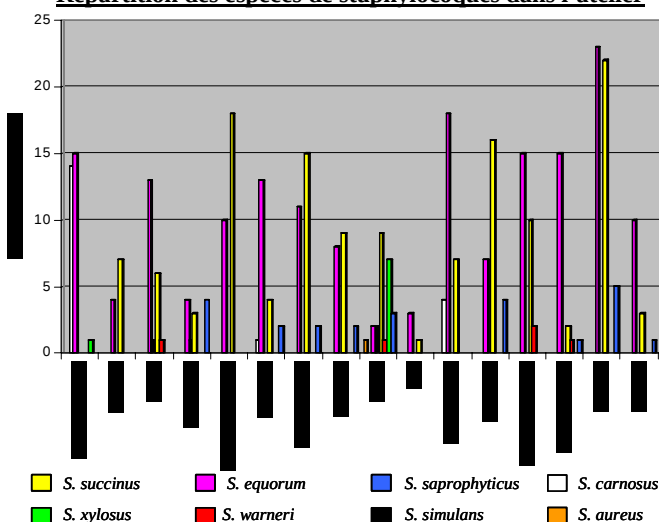
PCR multiplex



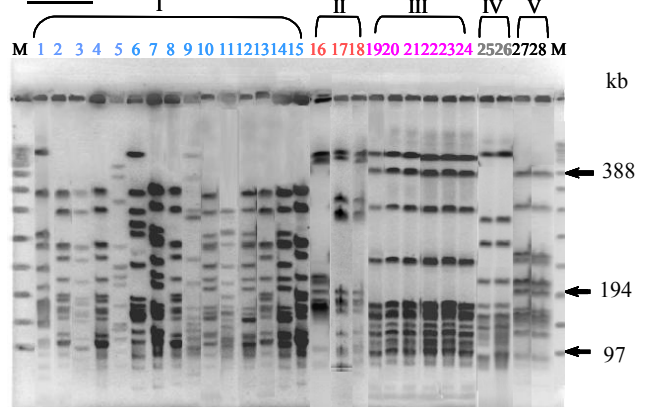
1=*S. sciuri*, 2=*Kocuria varians*, 3=*S. saprophyticus*, 4=*S. epidermidis*, 5=*S. aureus*, 8=*S. xylosus*, 11=*S. saprophyticus*, 6, 7, 9, 10 isolats de l'atelier

Avec la PCR multiplex, sur les 374 souches de coques à Gram positif, 10 n'appartiennent pas au genre *Staphylococcus* et 33 ont pu être identifiées: 24 appartiennent à l'espèce *S. saprophyticus*, 8 à l'espèce *S. xylosus* et 1 à l'espèce *S. aureus*. Mais 331 souches de *Staphylococcus* n'ont pas été identifiées au niveau de l'espèce. Ces souches ont alors été analysées par PFGE.

Répartition des espèces de staphylocoques dans l'atelier



PFGE



M= marqueur de taille lambda; 1 à 15= isolats du groupe I; 16 à 18= isolats du groupe II; 19 à 24= isolats du groupe III; 25 et 26= isolats du groupe IV; 27 et 28= isolats du groupe V.

Les 331 souches de *Staphylococcus* ont été classées par PFGE dans 5 groupes de restriction (I, II, III, IV et V).

Séquençage *sodA*

Le séquençage du gène *sodA* de souches représentatives de chacun des 5 groupes a été réalisé. Ainsi, les groupes I, II, III, IV et V ont été identifiés respectivement aux espèces *S. equorum*, *S. warneri*, *S. succinus*, *S. carnosus*, et *S. simulans*.

Sur 331 souches, 171 appartiennent à l'espèce *S. equorum*, 132 à *S. succinus*, 19 à *S. carnosus*, 5 à *S. warneri* et 4 à *S. simulans*.

Les espèces *S. equorum* et *S. succinus* dominent et colonisent cet atelier, que ce soit les surfaces, les matières premières ou le produit fini. En effet, 46 % des souches étudiées appartiennent à l'espèce *S. equorum* et 35 % à l'espèce *S. succinus*.

Les espèces *S. xylosus* et *S. saprophyticus* habituellement isolées dans les salaisons fermières sont ici retrouvées de façon minoritaire (respectivement 2 % et 7 %). L'espèce *S. xylosus* a été isolée à partir de la mèche mais n'est plus présente dans le saucisson. L'espèce *S. carnosus* présente ici la particularité d'être isolée à partir de surfaces (couteau et mur séchoir) et non dans la matière première et dans le produit fini.

D'autres espèces ont été isolées de façon sporadique; il s'agit des espèces *S. aureus* (isolée au niveau de la mèche), *S. warneri* (au niveau du billot et du saucisson) et *S. simulans* (au niveau du billot, de la carcasse et de la mèche).

Conclusion

- *S. succinus* et *S. equorum*, deux espèces peu décrites dans les salaisons, colonisent majoritairement cet atelier, des matières premières au produit fini ainsi que les surfaces.
- Les espèces *S. xylosus* et *S. saprophyticus* décrites habituellement comme colonisant les ateliers de salaison ont été isolées de façon sporadique dans cet atelier.

RÉSUMÉ

Certaines espèces de Staphylocoques à Coagulase Négative (SCN) sont naturellement présentes ou employées comme ferments de salaison. La diversité de cette flore au niveau des ateliers de salaisons reste mal connue en raison notamment de la difficulté à identifier les espèces de SCN. Nous avons développé une PCR spécifique pour identifier *Staphylococcus xylosus*, principale espèce présente dans les produits carnés fermentés. Une PCR multiplex ciblant *S. xylosus* et trois espèces de staphylocoques pathogènes opportunistes a été développée permettant l'identification de ces espèces et du genre *Staphylococcus*. Ces méthodes et des méthodes complémentaires basées sur la caractérisation des souches par analyse en PFGE après restriction de l'ADN, par séquençage du gène *sodA* et par hybridation avec des sondes spécifiques ont permis l'étude de la diversité des SCN d'ateliers de salaisons traditionnelles, artisanales ou industrielles. Nous avons pu montrer que, dans un atelier traditionnel n'utilisant aucun ferment, *S. equorum* et *S. succinus* ont colonisé majoritairement les produits et l'environnement alors que les espèces *S. xylosus* et *S. carnosus* habituellement utilisées comme ferments sont minoritaires et n'ont pas été retrouvées au niveau des produits finis. Le suivi de *S. carnosus* et *S. xylosus*, utilisés comme ferments dans un atelier artisanal et un industriel, a révélé qu'ils ne colonisent pas l'environnement et que *S. xylosus* devient dominant dans les produits. Il pourrait être intéressant de développer de nouveaux ferments appartenant aux espèces *S. equorum* ou *S. succinus* qui semblent adaptées à l'environnement carné.

Coagulase Negative Staphylococci community in the processing environment of dry sausages

Some Coagulase Negative Staphylococci (CNS) are naturally present or used as starters in sausage manufacture and are involved in the typical properties of these products. The diversity of this microbiota isolated from the products and the environment of units manufacturing sausages fermented without starter is few known, due to the difficulty to identify the CNS species. We have developed and validated a specific PCR to identify *S. xylosus*, the major species naturally present in meat products. To extend this PCR-based method, a multiplex PCR targeting the *Staphylococcus* genus, *S. xylosus* and three opportunistic food-borne pathogens *Staphylococcus* species has been developed. These methods and others based on strain characterization by DNA macro-restriction PFGE, *sodA* gene sequencing and specific probes hybridization allowed the study of the CNS diversity through units manufacturing sausages fermented with or without starter. We showed that, in dry sausages fermented without starter, *S. equorum* and *S. succinus* mainly colonized the products and the environment whereas the *S. carnosus* and *S. xylosus* species usually used as starters were found in minority and were not isolated in the final products. The monitoring of the starters *S. carnosus* and *S. xylosus* in artisanal and industrial units revealed, that these species did not colonized their environment and that *S. xylosus* quickly dominated in the products. It could be interesting to develop new starters with the species *S. equorum* or *S. succinus*, which seemed to be well-adapted to the meat environment.

DISCIPLINE : Science des Aliments

MOTS-CLES : Staphylocoques à Coagulase Négative - produits carnés fermentés - identification - diversité - environnement - *Staphylococcus equorum* - *Staphylococcus succinus* - *Staphylococcus xylosus* - *Staphylococcus carnosus*