

# Évaluation de l'innocuité des cultures de Liebefeld

Hans-Peter Bachmann, Christoph Kohn, Ueli von Ah et Noam Shani

Agroscope, 3003 Berne, Suisse

Renseignements: Hans-Peter Bachmann, e-mail: hans-peter.bachmann@agroscope.admin.ch



Figure 1 | Les cultures de Liebefeld sont proposées sous formes liquide et lyophilisée.

## Introduction

La production d'aliments fermentés requiert l'ajout de cultures microbiennes lors du processus de fabrication. Les bactéries contenues dans ces cultures étant présentes en grande quantité dans le produit fini, elles doivent répondre à certaines exigences de sécurité afin d'exclure des effets indésirables pour les consommateurs-trices. Les aliments fermentés traditionnels et les cultures microbiennes utilisées pour leur fabrication sont consommés depuis très longtemps sans poser de problèmes sanitaires (*long history of safe use*). On peut donc raisonnablement les considérer comme sûrs. Agroscope développe et produit une large gamme de cultures microbiennes dans le cadre d'un partenariat public-privé (PPP) (fig. 1).

Dans l'UE et en Suisse, les cultures microbiennes destinées à la production de denrées alimentaires ne sont soumises à aucune disposition légale spécifique. Selon

la règle générale en vigueur, les denrées alimentaires ne peuvent être mises sur le marché que si elles sont sûres et la sécurité alimentaire doit être assurée par le fabricant. L'autorisation de mise sur le marché n'est pas requise pour les cultures microbiennes, à moins qu'elles ne contiennent des espèces qui n'ont pas une *long history of safe use*.

Un inventaire des microorganismes dont l'utilisation dans les produits alimentaires fermentés est documentée a été publié en 2002 et mis à jour en 2018 (Bourdichon *et al.* 2018). L'EFSA, l'Autorité européenne de sécurité des aliments, a introduit en 2005 un concept fondé sur une présomption d'innocuité reconnue (*Qualified Presumption of Safety – QPS*) pour simplifier et harmoniser la procédure d'évaluation des microorganismes à faible risque.

Une espèce particulière se verra accorder le statut QPS si elle ne présente aucun problème de sécurité ou si les risques peuvent être écartés par des études. En outre, des recommandations sous la forme de «qualifications» ont été formulées pour certaines des espèces sélectionnées. De cette façon, des études inutiles peuvent être évitées sans affecter la sécurité (Leuschner *et al.* 2010).

La plupart des bactéries lactiques utilisées dans la production de produits laitiers fermentés et de nombreux autres aliments fermentés ayant obtenu le statut QPS, aucune évaluation particulière n'est requise (tabl. 1).

Toutefois, l'EFSA indique clairement que toute souche, même si elle dispose du statut QPS, doit être exempte de gènes de résistance aux antibiotiques d'importance clinique acquis et transmissibles. Ceci afin d'éviter que des gènes de résistances aux antibiotiques ne soient transférés des bactéries lactiques inoffensives à des agents pathogènes dangereux. Un tel transfert de gènes pourrait, dans le pire des cas, conduire à l'impossibilité de traiter des maladies infectieuses en raison d'une multi-résistance des agents pathogènes. De nombreuses opérations importantes (transplantations d'organes, césariennes, poses de prothèses de la hanche, etc.) ainsi que la chimiothérapie dans la lutte contre le cancer dépendent d'antibiotiques efficaces et pourraient éventuellement être compromises (OMS 2018). Les gènes de résistance sont diffusés par transfert horizontal, le plus fréquemment par le biais de plasmides (von Wintersdorff *et al.* 2016).

La résistance due à de tels gènes doit être clairement distinguée de la résistance naturelle qu'une bactérie pourrait présenter vis-à-vis d'un antibiotique. Dans ce cas, on parle d'une résistance intrinsèque. Celle-ci ne peut pas être transmise par simple transfert horizontal de gènes entre microorganismes. Par exemple, *Lactobacillus casei* est intrinsèquement résistant à la vancomycine parce que sa paroi cellulaire présente une particularité structurelle empêchant l'action de l'antibiotique (Billot-Klein *et al.* 1994).

Il n'y a pas de règle claire sur la façon de vérifier si une souche présente une résistance aux antibiotiques transmissible. Le groupe scientifique de l'EFSA sur les additifs et produits ou substances utilisés en alimentation animale (FEEDAP) a élaboré des lignes directrices concernant les additifs dans l'alimentation animale (EFSA 2012). Cette directive est appelée «avis scientifique» (*scientific opinion*) et constitue une base adéquate, largement acceptée, pour évaluer les souches utilisées dans la production d'aliments fermentés (fig. 2).

Outre les gènes de résistance aux antibiotiques acquis, il existe deux autres domaines dans lesquels les exigences

## Résumé

Les souches microbiennes qu'Agroscope utilise pour les essais dans la pratique et qui, si les essais sont concluants, feront ensuite partie d'une culture mixte définie, doivent présenter un niveau élevé de sécurité. L'analyse de 164 souches de bactéries lactiques de la collection de souches d'Agroscope a permis d'évaluer leur innocuité en termes de résistance aux antibiotiques transmissible, de formation d'amines biogènes et de présence de facteurs de virulence. Seules six souches ont dû être exclues, car elles présentaient une ou plusieurs résistances aux antibiotiques transmissibles. Ces souches ont été isolées il y a seulement quelques années. La plupart des souches de la collection d'Agroscope ont été isolées il y a plusieurs décennies, à une époque où les résistances ne s'étaient pas encore propagées. Outre l'âge élevé de la plupart des isolats, leur grande biodiversité et leur grand nombre confèrent à la collection de souches d'Agroscope une valeur inestimable.

en matière de sécurité des cultures microbiennes doivent être respectées: elles ne doivent pas former d'amines biogènes ni être porteuses de facteurs de virulence critiques. Les amines biogènes se forment lors de la décarboxylation des acides aminés. Les microorganismes utilisés pour les cultures ne doivent donc contenir ni d'histidine ni de tyrosine décarboxylase afin d'éviter la formation d'histamine et de tyramine – les deux amines biogènes les plus importantes dans le fromage.

Les facteurs de virulence sont des substances produites par un microorganisme pathogène qui lui permettent d'induire une infection, de survivre dans l'environnement hostile de l'hôte et de provoquer une maladie (Chen *et al.* 2016). Les souches utilisées pour les cultures devraient être exemptes de facteurs de virulence, même si elles appartiennent à une espèce bénéficiant du statut QPS. Au moyen de bases de données, on peut effectuer rapidement un screening des génomes à la recherche de gènes codant pour des facteurs de virulence. Cependant, les résultats sont souvent difficiles à interpréter. En effet, un gène qui permet à la souche concernée de coloniser l'intestin indique clairement la présence d'un facteur de virulence chez les bactéries pathogènes, alors que chez une espèce commensale, ce gène pourrait au contraire s'avérer souhaitable.

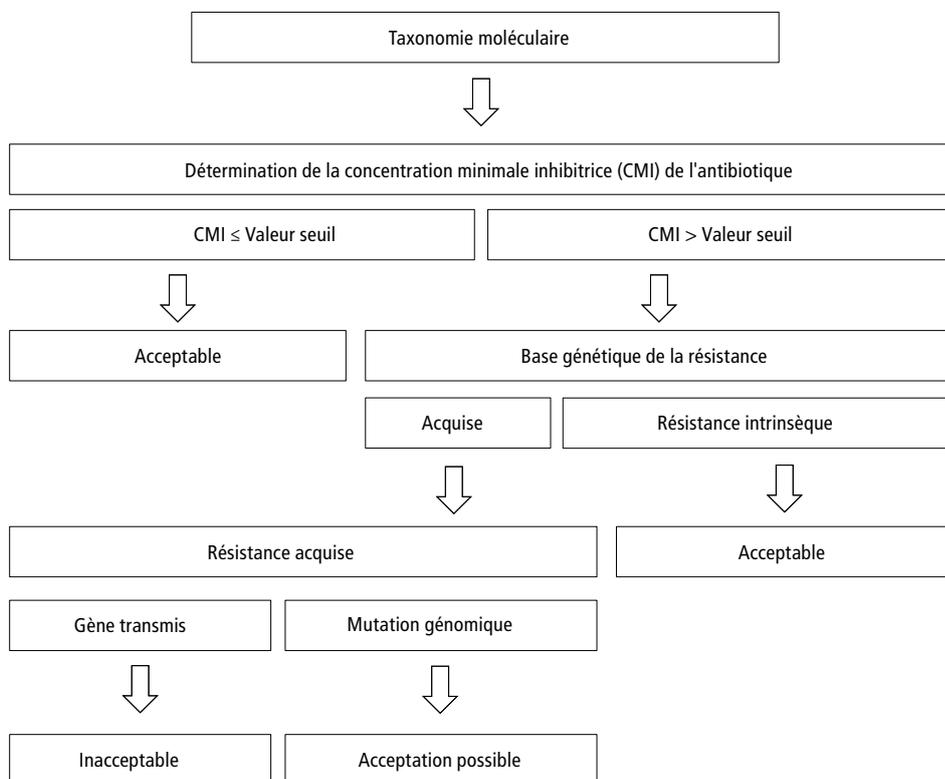
Un élément important de la sécurité des cultures est également l'absence de contamination par des germes pathogènes au cours de la production. Or, cet aspect fait partie des bonnes pratiques de fabrication et n'est pas traité ici.

## Matériel et méthodes

Les génomes de 164 souches ont été entièrement séquencés sur la plateforme de *Next Generation Sequencing* (NGS) de l'Université de Berne à l'aide de la technologie Illumina, puis assemblés et annotés à l'*Interfaculty Bioinformatics Unit* de l'Université de Berne et saisis dans la base de données interne Dialact.

Les recommandations de l'EFSA ont servi de base à la procédure d'évaluation de la sécurité (fig. 3). La résistance aux antibiotiques a été testée en utilisant deux approches complémentaires (phénotypique et génotypique). L'analyse phénotypique de la résistance aux antibiotiques a été effectuée selon le protocole standard ISO 10932 | IDF 223:2010 pour les bactéries lactiques. La concentration minimale inhibitrice (CMI) qui a été déterminée a été comparée aux seuils microbiologiques définis par l'EFSA (valeurs ECOFF pour *ecological cut-*

*offs*) et les souches ont été classées dans les catégories «sensibles» ou «résistantes» (EFSA 2012). Les gènes de résistance aux antibiotiques connus ont été recherchés dans les séquences des génomes complets à l'aide de deux applications web différentes, largement acceptées à l'échelle internationale et très utilisées (Zankari *et al.* 2013). Les séquences nucléiques ont été testées avec ResFinder (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>, consulté le 13.3.2019) et les séquences d'acides aminés ont été comparées avec un outil propre à Dialact basé sur BLAST, qui permet de rechercher dans les génomes entiers les séquences de référence disponibles dans la banque de données ARG-ANNOT (<http://backup.mediterranee-infection.com/article.php?laref=282&titre=arg-annot>, consulté le 13.3.2019). La résistance à l'antibiotique en question a été qualifiée de «non transmissible» dans les cas où l'ECOFF d'un antibiotique donné était dépassé dans une large proportion de souches de la même espèce, sans qu'aucun gène de résistance n'ait été trouvé dans leur génome (ni même un gène défectueux qui pourrait néanmoins avoir un certain effet). L'origine de la souche et la date d'isolement ont également été prises en compte dans la synthèse, de même que les connaissances décrites dans la littérature scientifique.



**Figure 2** | Proposition de l'EFSA pour l'évaluation de la résistance antimicrobienne des souches bactériennes utilisées comme additifs dans l'alimentation (EFSA, 2012). CMI = concentration minimale inhibitrice.

**Tableau 1 | Bactéries lactiques ayant obtenu le statut QPS (Ricci et al. 2017).**

Genre	Espèce
<i>Carnobacterium</i>	<i>divergens</i>
<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i> , <i>amyolyticus</i> , <i>amylovorus</i> , <i>animalis</i> , <i>alimentarius</i> , <i>aviarius</i> , <i>brevis</i> , <i>buchneri</i> , <i>casei</i> <sup>a</sup> , <i>cellobiosus</i> , <i>collinoïdes</i> , <i>coryniformis</i> , <i>crispatus</i> , <i>curvatus</i> , <i>delbrueckii</i> , <i>diolivorans</i> , <i>farciminis</i> , <i>fermentum</i> , <i>gallinarum</i> , <i>gasseri</i> , <i>helveticus</i> , <i>hilgardii</i> , <i>johnsonii</i> , <i>kefirnofaciens</i> , <i>kefiri</i> , <i>mucosae</i> , <i>panis</i> , <i>paracasei</i> , <i>paraplantarum</i> , <i>pentosus</i> , <i>plantarum</i> , <i>pontis</i> , <i>reuteri</i> , <i>rhamnosus</i> , <i>sakei</i> , <i>salivarius</i> , <i>sanfranciscensis</i>
<i>Lactococcus</i>	<i>lactis</i>
<i>Leuconostoc</i>	<i>citreum</i> , <i>lactis</i> , <i>mesenteroides</i> , <i>pseudomesenteroides</i>
<i>Oenococcus</i>	<i>oeni</i>
<i>Pediococcus</i>	<i>acidilactici</i> , <i>dextrinicus</i> , <i>parvulus</i> , <i>pentosaceus</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i>

<sup>a</sup>*L. zeae* a été incluse dans l'espèce *L. casei*.

La capacité des souches à former des amines biogènes peut être déterminée par divers tests complémentaires. L'EFSA recommande une analyse chimique consistant à cultiver la souche concernée dans un milieu nutritif, puis à mesurer les amines biogènes libérées. Une alternative consiste à rechercher les séquences des gènes codant pour des décarboxylases connues dans le génome complet ou à les détecter directement par PCR. Pour la présente étude, les séquences nucléiques des souches à tester ont été comparées à des séquences de quatre tyrosine décarboxylases (présentes respectivement chez *Lactobacillus brevis*, *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus faecalis*) et deux histidine décarboxylases (présentes chez *Lactobacillus parabuchneri* et *Streptococcus thermophilus*) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Si l'analyse phénotypique et/ou génotypique indiquait la présence d'une activité décarboxylase indésirable, la souche concernée a été exclue. Il n'y a aucune prescription en matière de méthode de test pour les facteurs de virulence. Comme de nombreux facteurs de virulence sont décrits, le dépistage par des méthodes phénotypiques est très difficile. En général, les gènes de virulence connus sont recherchés dans le génome des souches examinées. Les souches d'Agroscope ont été analysées avec l'application web VFAnalyzer et la base de données VFDB (<http://www.mgc.ac.cn/cgi-bin/VFs/v5/main.cgi?func=VFAnalyzer>). Si un gène codant potentiellement pour un facteur de virulence a été détecté, une clarification approfondie a été effectuée pour répondre aux questions suivantes: Comment la séquence concernée est-elle annotée dans différentes bases de données? Comment le risque est-il

## Les outils bioinformatiques employés pour l'analyse de l'innocuité des souches

Divers outils bioinformatiques développés ces dernières années permettent la recherche de gènes de résistance aux antibiotiques ou codant pour des facteurs de virulence dans les génomes de bactéries. Dans le cadre du contrôle de l'innocuité de nos souches, les outils suivants ont été employés.

**ResFinder** (Zankari et al., 2012) v. 3.1 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>, consulté le 13.03.2019) permet de détecter des gènes de résistance aux antibiotiques en comparant le génome des souches à une banque de gènes de résistance décrits. Cette dernière est régulièrement actualisée. Pour cette analyse, la détection se base sur la comparaison des acides nucléiques avec l'algorithme BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

**ARG-ANNOT** (Antibiotic Resistance Gene-ANNOTation, Gupta et al., 2014) v. 4 (<http://backup.mediterranean-infection.com/article.php?laref=282&titre=arg-annot>, consulté le 13.03.2019) permet la recherche de gènes de résistance connus ou potentiellement nouveaux à l'aide de l'algorithme BLAST. La banque de données employée est également mise à jour régulièrement. Cet outil a été utilisé dans le cadre de notre recherche avec les séquences d'acides aminés.

**VFAnalyzer** (Chen et al., 2005) (<http://www.mgc.ac.cn/cgi-bin/VFs/v5/main.cgi?func=VFAnalyzer>, consulté le 13.03.2019) permet la détection de gènes codant pour des facteurs de virulence potentiels par comparaison des séquences nucléiques des génomes avec la banque de données VFDB, recueil de gènes décrits dans différentes banques de données, telles que p.ex. Uniprot (<https://www.uniprot.org/>).

estimé dans la littérature disponible? La séquence affectée n'est-elle présente que dans la souche étudiée ou est-elle très courante chez la même espèce? Pour certaines souches, un test d'hémolyse phénotypique a été effectué en plus (incubation 24h à 30°C sur gélose au sang de mouton). Sur la base de cette clarification, il a été décidé s'il s'agissait d'un résultat critique et si la souche devait être écartée.

## Résultats et discussion

### Résultats pour les souches pures

Les résultats des contrôles de sécurité des bactéries lactiques pour les cultures ayant une composition définie sont résumés dans le tableau 2. Les souches de la collection d'Agroscope présentent globalement un haut niveau de sécurité. Sur un total de 164 souches contrôlées, seules six ont dû être exclues, car elles présentaient une résistance aux antibiotiques transmissible. Ces souches appartiennent toutes à la sous-espèce *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* et ont été isolées de lait cru. On sait que les lactocoques peuvent être responsables d'un transfert de gènes horizontal soutenu. Toutes les souches résistantes ont été isolées après 2003. Il s'agit là d'une indication importante que la probabilité d'isoler des souches présentant une résistance acquise aux antibiotiques a augmenté au fil des années. Quatre souches ont été isolées de lait de chèvre cru de l'Emmental, ce qui montre à quel point la résistance aux antibiotiques est aujourd'hui

répandue. Les résultats des différentes méthodes d'analyse concordent très bien (tabl. 3). Les seuils de résistance sont de respectivement 1 (érythromycine, clindamycine) et 4 (tétracycline) mg/L (EFSA; 2012). Le gène *erm* code pour la résistance à l'érythromycine et une résistance constitutive ou inducible à la clindamycine et à la streptogramine B. L'érythromycine appartient au groupe des antibiotiques macrolides.

Comme attendu, les résistances non transmissibles étaient spécifiques au genre ou à l'espèce. Chez *Leuconostoc* sp. et les lactobacilles homofermentaires, on a fréquemment observé une résistance à la kanamycine de même qu'une résistance à la vancomycine chez les lactobacilles hétérofermentaires facultatifs. Chez les pédiocoques, quatre des onze souches étudiées ont présenté une résistance non transmissible à la tétracycline, ce qui correspond bien aux résultats de Lüdin et al. 2018.

En ce qui concerne les facteurs de virulence, toutes les souches examinées présentaient une séquence codant pour une hémolysine décrite chez *Clostridium*

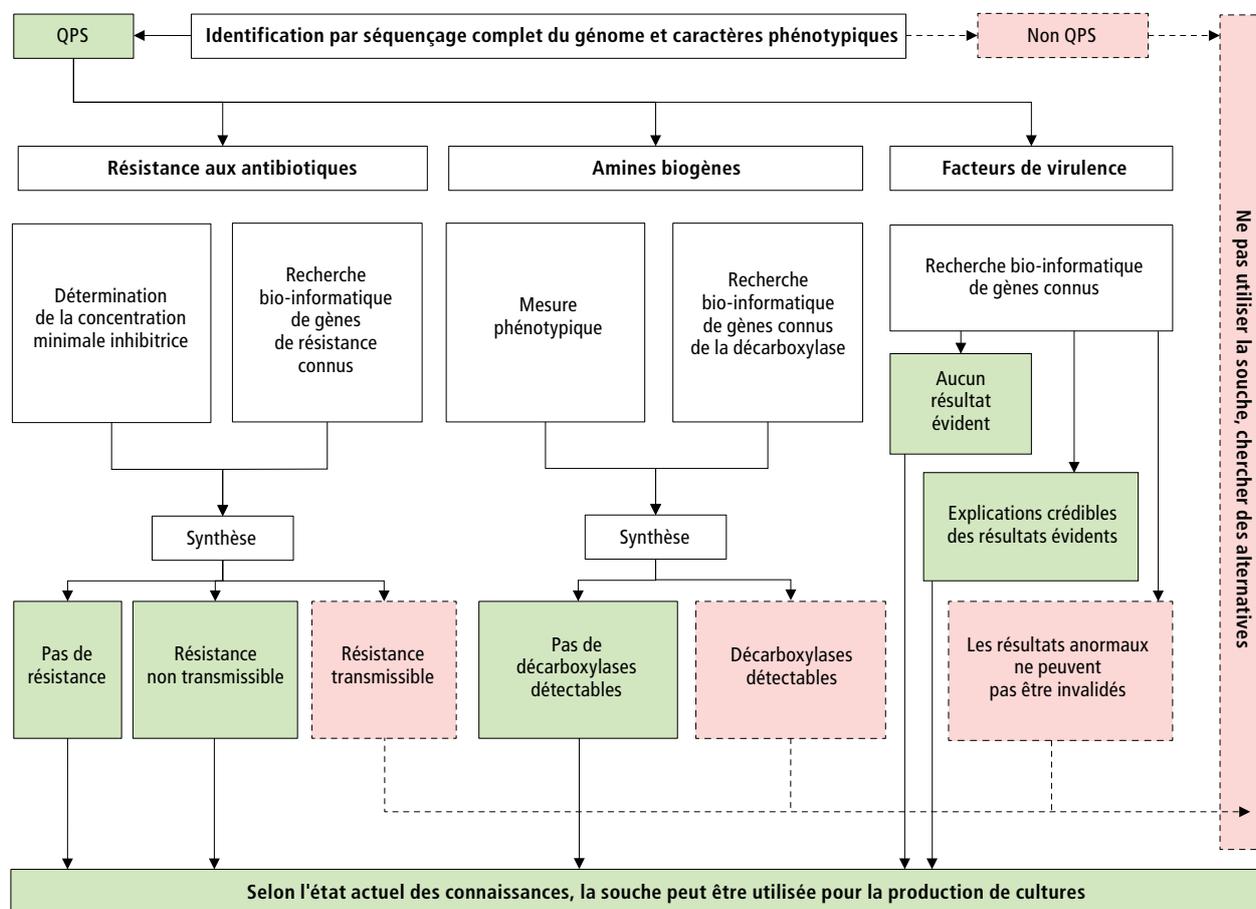


Figure 3 | Procédure d'Agroscope pour tester la sécurité des souches de bactéries lactiques utilisées dans les cultures de composition définie. QPS = *qualified presumption of safety* (présomption d'innocuité reconnue).

**Tableau 2 | Résultats des analyses de sécurité menées sur les souches utilisées dans les cultures expédiées et les cultures d'essai.**

Clarifications		Nombre de souches testées par genre				
Critères	Résultat	<i>Lactococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Leuconostoc</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Pediococcus</i>
Antibiorésistance	Aucune	71	21	21	15	7
	Pas transmissible	0	0	2	16	4
	Transmissible	6	0	0	0	0
Décarboxylases	Aucune	12	21	4	31	11
	Disponible	0	0	0	0	0
Facteurs de virulence	Discret	0	0	0	0	0
	Explicable	12	21	4	31	11
	Critique	0	0	0	0	0

sp. Le doute quant à la présence d'un réel facteur de virulence peut être levé en considérant tout d'abord que la séquence correspondante est annotée dans la base de données Uniprot (<https://www.uniprot.org/>) comme ARNr méthyltransférase présumée. Deuxièmement, la séquence est très répandue chez les bactéries lactiques, très probablement même un composant du génome «de base» (*core genome*). Troisièmement, un test d'hémolyse phénotypique a été effectué sur certaines souches pour des raisons de sécurité. Aucune des souches examinées n'a formé de halo et n'est donc capable d'hémolyse.

#### Cas particulier: cultures mixtes non définies

Les cultures mixtes non définies sont des mélanges de souches de différentes espèces agissant de concert, les souches n'étant pas disponibles isolément. Ces mélanges ont été obtenus empiriquement et sont considérés comme des cultures traditionnelles. Le concept QPS ne peut leur être appliqué que dans une mesure limitée et une évaluation poussée de leur sécurité n'est pas requise. Toutefois, les espèces dont elles sont constituées sont généralement connues et un certain nombre d'analyses peuvent être effectuées pour garantir leur innocuité selon les critères suivants:

- La culture elle-même et les espèces qui la composent ont une *long history of safe use*.
- Seules les espèces ayant le statut QPS sont présentes dans la culture et celle-ci est exempte de germes étrangers.
- La culture ne forme pas d'amines biogènes. Étant donné que, pour une PCR, un isolement préalable de la souche à tester n'est pas nécessaire, les cultures mixtes non définies peuvent également être analysées par ce biais. Comme alternative, une analyse chimique peut être effectuée dans un milieu de culture ou directement dans l'aliment fermenté.

Dans le cas de la résistance aux antibiotiques, le contrôle s'avère un peu plus compliqué. Les recommandations de l'UE se réfèrent à des souches pures et ne conviennent pas aux cultures mixtes non définies (EFSA 2012). Les espèces représentées dans les cultures sont certes connues, mais pas les souches ni leurs proportions respectives. Pour éviter ce problème, Agroscope a développé une méthode qui, basée sur la microcalorimétrie isothermique, permet de mesurer la CMI (von Ah *et al.* 2018). Le niveau de sécurité des cultures mixtes non définies peut par ailleurs être amélioré grâce à l'analyse de leur mé-

**Tableau 3 | Résultats des études phénotypiques et génotypiques dans les six souches présentant une résistance acquise aux antibiotiques.**

Méthode d'essai pour la détermination de la résistance aux antibiotiques	Souches étudiées		
	FAM-17868	FAM-23213 FAM-23214 FAM-23215 FAM-23220	FAM-23218
Phénotypique (concentration minimale inhibitrice en mg/L)	Non déterminé	Clindamycine > 4 Érythromycine > 8 Tétracycline > 16	Tétracycline > 16
Génotypique à l'aide de ResFinder	Résistance aux macrolides <i>erm</i> (B)	Résistance aux macrolides <i>erm</i> (B) Résistance à la tétracycline <i>tet</i> (M)	Résistance à la tétracycline <i>tet</i> (S)
Génotypique avec ARG-ANNOT	Résistance aux macrolides <i>erm</i> (B)	Résistance aux macrolides <i>erm</i> (B) Résistance à la tétracycline <i>tet</i> (M)	Résistance à la tétracycline <i>tet</i> (S)

tagénome: d'une part, l'examen du gène codant pour la sous-unité 16S du ribosome permet de mettre en évidence des espèces encore non détectées; d'autre part, les séquences de gènes de résistance connus peuvent être recherchées directement dans le métagénome.

#### Valeurs seuil définies de manière imprécise

Dans le cas des lactobacilles homofermentaires, les données disponibles concernant la résistance aux antibiotiques proviennent principalement de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, une sous-espèce utilisée dans la fabrication des yogourts. Or, dans la fabrication fromagère, on utilise surtout la sous-espèce *L. delbrueckii* subsp. *lactis*. Lors d'études internes portant sur des souches de *L. delbrueckii* subsp. *lactis*, 80 % de celles-ci présentaient des valeurs CMI supérieures aux seuils de l'EFSA pour la kanamycine (données d'Agroscope non publiées précédemment). De nombreuses souches de *Leuconostoc* sp. présentent également des valeurs CMI supérieures au seuil défini pour la kanamycine. Étant donné qu'aucun gène de résistance connu n'a pu être détecté dans le génome des souches testées et qu'il est très peu probable que tant de souches différentes aient acquis un gène de résistance inconnu contre cet antibiotique il y a plusieurs décennies déjà, il est fort probable que le seuil ait été défini de manière imprécise en raison d'un manque de données. L'EFSA devrait donc réexaminer le seuil de 16 mg/L pour *L. delbrueckii* ssp. et *Leuconostoc* sp. Agroscope publiera ses résultats et entend ainsi apporter sa contribution au débat. Comme toutes les souches ne présentent pas cette propriété, on ne peut pas parler de résistance intrinsèque.

Une situation comparable existe avec *Pediococcus acidilactici*. Chez cette espèce, de nombreuses souches présentent des valeurs CMI supérieures au seuil défini pour la tétracycline sans qu'aucun gène de résistance n'ait pu être détecté. Lüdin *et al.* (2018) proposent donc de réévaluer le seuil de 8 mg/L.

## Conclusions

Les souches qu'Agroscope sélectionne pour les cultures de Liebefeld sont généralement très sûres. Elles n'ont pas de gènes de résistance aux antibiotiques transmissibles, aucun facteur de virulence critique et ne forment pas d'amines biogènes. Ceci est notamment dû au fait que de nombreuses souches ont été isolées à une époque où on utilisait moins d'antibiotiques et où les gènes de résistance n'avaient pas encore pu se propager. De nombreuses souches sont également issues de cultures ayant été utilisées pendant de longues années sans problème de sécurité.

Une analyse du génome complet ne permet de rechercher que les gènes de résistance connus. Par ailleurs, il existe de nombreux gènes dont la fonction n'a jamais été clairement confirmée, ce qui entraîne des ambiguïtés et complique l'interprétation des résultats. Il importe donc que les analyses soient répétées régulièrement pour tenir compte de l'évolution des connaissances.

Les souches utilisées dans les cultures de surface pour la croûte fleurie ou la croûte emmorgée des fromages ont certes également une *long history of safe use*, mais elles n'ont pas toutes le statut QPS. Même si la croûte du fromage est généralement coupée avant consommation, il reste encore quelques questions en suspens qui devront être clarifiées au cours des prochaines années. ■

**Riassunto****Testata la sicurezza delle colture di Liebefeld**

I ceppi microbici utilizzati da Agroscope per i test pratici e che, in caso di successo, diventano poi parte integrante delle colture miste definite, devono attestare una sicurezza elevata. Per questo sono stati testati 164 ceppi di batteri lattici della raccolta di ceppi di Agroscope per analizzare la sicurezza per quanto concerne le resistenze trasmissibili agli antibiotici, la formazione di ammine biogene e la presenza di fattori di virulenza. Solo sei ceppi hanno dovuto essere esclusi in quanto presentavano una o più resistenze trasmissibili agli antibiotici. Questi ceppi sono stati isolati solo pochi anni fa. Tuttavia, la maggior parte dei ceppi della raccolta sono stati isolati da diversi decenni, in un momento in cui le resistenze non si erano ancora diffuse. La raccolta dei ceppi ha un valore inestimabile anche per l'elevata biodiversità e il grande numero di ceppi.

**Summary****Safety clearances for the Liebefeld cultures**

The microbial strains that Agroscope uses for practical trials and which, if successful, subsequently become part of a defined mixed culture, must demonstrate a high level of safety. With this end in view, 186 strains of lactic acid bacteria from the Agroscope Culture Collection were tested for transferable antibiotic resistances, the formation of biogenic amines, and the presence of virulence factors. Only six strains had one or more transferable antibiotic resistances, and thus had to be ruled out. These strains were only isolated a few years ago. By contrast, the majority of strains from the Culture Collection were isolated several decades ago, at a time when resistances were probably not yet spread to such a large extent as they are today. The Culture Collection is also of inestimable value owing to its high biodiversity and the large number of strains it contains.

**Key words:** microbial cultures, transferable antibiotic resistances, biogenic amines, virulence factors.

**Bibliographie**

- Billot-Klein D., Gutmann L., Sable S., Guittet E. & Van Heijenoort J., 1994. Modification of peptidoglycan precursors is a common feature of the low-level vancomycin-resistant VANB-type enterococcus D366 and of the naturally glycopeptide-resistant species *Lactobacillus casei*, *Pediococcus pentosaceus*, *Leuconostoc mesenteroides*, and *Enterococcus gallinarum*. *Journal of Bacteriology* **176** (8), 2398–2405.
- Bourdichon F., Alper I., Bibiloni R., Dubois A., Laulund S., Miks M., Morelli L., Zuliani V. & Yao, S., 2018. Inventory of microbial food cultures with safety demonstration in fermented food products. *Bulletin IDF-FIL* **495**, 1–51.
- Chen L., Zheng D., Liu B., Yang J. & Jin Q., 2016. VFDB 2016: hierarchical and refined dataset for big data analysis-10 years on. *Nucleic Acids Research*. **44** (D1) D694–D697. Accès: <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1239>.
- EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP), 2012. Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. *EFSA Journal* **10** (6), 2740. Accès: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2740>.
- Leuschner R. G. K., Robinson T. P., Hugas M., Cocconcelli P. S., Richard-Forget F., Klein G., Licht T. R., Nguyen-The C., Querol A., Richardson M., Suarez J. E., Thrane U., Vlaskovic J. M. & von Wright A., 2010. Qualified presumption of safety (QPS): a generic risk assessment approach for biological agents notified to the European Food Safety Authority (EFSA). *Trends in Food Science & Technology* **21** (9), 425–435. Accès: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.07.003>.
- Lüdin P., Roetschi A., Wuethrich D., Bruggmann R., Berthoud H. & Shani N., 2018. Update on tetracycline susceptibility of *Pediococcus acidilactici* based on strains isolated from swiss cheese and whey. *Journal of Food Protection* **81** (10), 1582–1589. Accès: <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-18-160>.
- Ricci A., Allende A., Bolton D., Chemaly M., Davies R., Girones R., Herman L., Koutsoumanis K., Lindqvist R., Nørrung B., Robertson L., Ru G., Sanaa M., Simmons M., Skandamis P., Snary E., Speybroeck N., Ter Kuile B., Threlfall J., Wahlström H., Cocconcelli P.S., Klein G., Prieto Maradona M., Querol A., Peixe L., Suarez J.E., Sundh I., Vlaskovic J.M., Aguilera-Gómez M., Barizzone F., Brozzi R., Correia S., Heng L., Istace F., Lythgo C., & Fernández Escamez P.S., 2017. Scientific opinion on the update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA. *EFSA Journal* **15** (3), 4664. Accès: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4664>.
- van Ah, U., Shani N., Chollet M., Solokhina A. & Braissant O., 2018. Measuring antibiotic resistance in mixed cultures: Isothermal microcalorimetry as a novel analytical tool. *International Dairy Journal* **77**, 73–79. Accès: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2017.09.007>.
- von Wintersdorff C. J. H., Penders J., van Niekerk J. M., Mills N. D., Majumder S., van Alphen L. B., Savelkoul P. H. M., & Wolfs P. F. G., 2016. Dissemination of antimicrobial resistance in microbial ecosystems through horizontal gene transfer. *Frontiers in Microbiology* **7** (173) 1–10. Accès: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00173>.
- WHO, 2018. Antimicrobial resistance. *Fact sheet WHO*. Accès: <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance> [13.3.2019].
- Zankari E., Hasman H., Sommer Kaas R., Seyfarth A.M., Agersø Y., Lund O., Voldby Larsen & Aarestrup F.M., 2013. Genotyping using whole-genome sequencing is a realistic alternative to surveillance based on phenotypic antimicrobial susceptibility testing. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **68** (4) 771–777. Accès: <https://doi.org/10.1093/jac/dks496>.