

Rapport Annuel d'Activité

2018

**Centre National de Référence
des *Listeria***

**Année d'exercice
2017**

RESPONSABLE :
RESPONSABLE ADJOINT :
INGENIEUR :
MEDECIN CHERCHEUR :
TECHNICIENS :

Marc LECUIT
Alexandre LECLERCQ
Mylène MAURY
Caroline CHARLIER-WOERTHER
Hélène BRACQ-DIEYE
Pierre THOUVENOT
Guillaume VALES
Nathalie TESSAUD-RITA
Nathalie BOUSQUET

ASSISTANTE :

AVANT-PROPOS

Le Centre National de Référence des *Listeria* remercie l'ensemble de ses correspondants pour l'envoi des souches et de leurs informations associées, dans le cadre de la surveillance microbiologique de la listériose en France en 2017.

Toute reproduction ou représentation intégrale ou partielle, par quelque procédé que ce soit, des pages publiées dans le présent rapport, faite sans l'autorisation écrite du CNR des Listeria est illicite. Seules sont autorisées, d'une part, les reproductions strictement réservées à l'usage privé du copiste et non destinées à une utilisation collective, et d'autre part, les analyses et courtes citations justifiées par le caractère scientifique ou d'information de l'œuvre dans laquelle elles sont incorporées tout en mentionnant clairement les références de ce présent rapport (A. Leclercq, C. Charlier, M.M. Maury and M. Lecuit. 2018. Rapport annuel d'activité du Centre national de Référence des Listeria – Année 2017. Institut Pasteur, Paris, France) dont elles sont issues.

RESUME

En 2017, le Centre National de Référence *Listeria* (CNRL) a séquencé 2150 souches de *Listeria* dans le cadre de son activité de surveillance (n=1765) et d'études d'investigations, clusters et épidémies (n=385), dont 1519 souches d'alertes produits et humaines. En 2017, le CNRL a réceptionné 397 souches humaines. Le CNRL a caractérisé et typé l'ensemble de ces souches dans le cadre de la surveillance microbiologique de la listériose (Annexe A). Ces activités ont été effectuées en conformité avec son accréditation COFRAC (Attestation d'accréditation N°8-2588) selon la norme NF EN ISO 15189.

Le CNRL a été sollicité par les autorités sanitaires françaises pour la gestion d'alertes sur des produits contaminés en France et dans le cadre d'alertes européennes et internationales. En 2017, aucune épidémie n'est survenue.

En 2017, de nombreux échanges d'informations ont été faits entre le CNRL et les structures de surveillance européennes de la listériose par le biais de la plateforme EPIS (Epidemic Intelligence Information System) de l'ECDC lors des alertes sanitaires européennes, et des programmes TESSY (The European Surveillance System) et ELITE (European *Listeria* Typing Exercise) de surveillance microbiologique moléculaire européenne. Le CNRL/CC-OMS *Listeria* a participé à l'investigation de 8 alertes.

Le CNRL participe à la détection des cas groupés et à l'identification de la source de contamination, en lien avec Santé Publique France (SPF) et les autres partenaires de la cellule *Listeria*. La méthode de typage moléculaire des souches est le cgMLST (core genome MultiLocus Sequence Typing), devenue la méthode de typage de référence pour la surveillance microbiologique de *Lm* en France.

La caractérisation moléculaire par cgMLST des souches cliniques, alimentaires et environnementales, permet également de détecter l'émergence éventuelle de clones d'intérêt épidémiologique et microbiologique, et de mieux comprendre les bases moléculaires de la virulence de *Lm*. Elle permet également l'étude de la biodiversité et l'évolution de *L. monocytogenes*.

Le CNRL a publié en Janvier 2017 les résultats de l'étude prospective nationale MONALISA (inclusions de 818 cas de listériose entre 2009 à 2013). Cette étude a permis de mieux caractériser la présentation clinique des listérioses invasives et d'identifier de nouveaux facteurs pronostiques, notamment thérapeutiques (Charlier et al, Lancet Infect Dis, 2017, (1)). Le CNRL a également poursuivi l'étude des formes rares de listériose (Danion et al., Clin Microbiol Infect, 2017 (5); Chersich et al., Occul Immunol Inflamm, 2017 (2)).

Le CNRL a poursuivi un projet collaboratif avec la Faculté Vétérinaire de Bern (Suisse) sur la comparaison des listérioses humaines et animales (financement Sinergia du Fonds National Suisse de la Recherche Scientifique). Ceci a notamment permis l'analyse radiologique des neurolistérioses, qui a été acceptée pour publication (Charlier et al., 2018, Clin Infect Dis (3)).

En lien avec l'Unité de Biologie des Infections, auquel il est affilié, le CNRL participe à des travaux visant à améliorer l'identification et la caractérisation des souches (caractérisation des facteurs de virulence, étude de la biodiversité et de la structure génétique des espèces du genre *Listeria* et de leur évolution), et à comprendre la physiopathologie de la listériose. Ces travaux ont notamment abouti cette année à la publication d'une étude sur les souches de *L. monocytogenes* non hémolytiques (Maury et al. Infect Immun, 2017 (4)).

SUMMARY

In 2017, the National Centre of reference for *Listeria* (CNRL) has sequenced 2150 strains of *Listeria* in the framework of its activity of surveillance (n=1765) and of studies of investigations, clusters and outbreaks (n=385), including 1519 food alerts and human strains. In 2017, the NRCL has received 397 human strains. The NRCL has characterized and typed all the strains in the framework of the microbiological surveillance of listeriosis (Annex A). These activities were done with its accreditation COFRAC (Accreditation Certificate N°8-2558) according to the standard NF EN ISO 15189.

The NRCL was requested by French Safety Authority for the management of alerts on contaminated food products in France and in the framework of European or international alerts. In 2017, no outbreak occurred.

In 2017, numerous information exchanges were done between NRCL and structure of European surveillance of listeriosis by the EPIS platform EPIS (Epidemic Intelligence Information System) of ECDC during European health alerts, and the TESSY program (The European Surveillance System) and ELITE (European *Listeria* Typing Exercise) of European microbiological molecular surveillance. The NRCL/WHO-CC *Listeria* contributed to investigation of 8 urgent inquiries.

The NRCL participates in the detection of human cluster and identification of the source of contamination, with Santé Publique France (SPF) and other members of the *Listeria* cell, based on cgMLST (core genome MultiLocus Sequence Typing), becoming the reference method of typing for the microbiological surveillance of *Lm* in France.

Molecular characterization by cgMLST of clinical strains, but also food and environmental strains, allowed to detect possible emergence of clones with epidemiological and microbiological interest, and to better understand the molecular basis of virulence of *Lm*. It also allowed the study of biodiversity and evolution of *Lm*.

The NRCL has published in January 2017 results of the national prospective study MONALISA (inclusion of 8181 cases between 2009 and 2013). This study has allowed to better characterize the clinical presentation of invasive listeriosis and better identify new prognostic factors including therapeutic (Charlier et al, Lancet Infect. Dis, 2017, (1)). The NRCL has also continued the study of rare clinical forms of invasive listeriosis (Danion et al., Clin Microbiol Infect, 2017 (5); Chersich et al., Occul Immunol Inflamm, 2017 (2)).

The NRCL has finalized a collaborative project with the veterinary faculty of Bern (Switzerland) on the comparison of human and animal listeriosis (Grant Sinergia Study of Fonds National Suisse de la Recherche Scientifique). This has allowed radiological analysis of neurolisteriosis, which has been accepted for publication (Charlier et al., 2018, Clin Infect Dis (3)).

In connection with Biology of Infection Unit, with which it is affiliated, the NRCL participates to work in the aim of improving the identification and characterization of strains (characterization of virulence factors, study of biodiversity and genetic structure of the species of *Listeria* genus and of its evolution), and to understand the physiopathology of listeriosis. These works resulted in particular this year in the publication of a study on non-hemolytic *L. monocytogenes* (Maury et al. Infect Immun, 2017 (4)).

TABLE DES MATIERES

1. MISSIONS ET ORGANISATION DU CNR.....	8
1.1. ORGANISATION ET EVOLUTIONS INTERVENUES EN 2017.....	8
1.2. ACCREDITATION	8
2. ACTIVITES D'EXPERTISE.....	10
2.1. EVOLUTION DES TECHNIQUES	10
2.2. TRAVAUX D'EVALUATION DES TECHNIQUES, REACTIFS ET TROUSSES.....	10
2.3. TECHNIQUES TRANSFEREES VERS D'AUTRES LABORATOIRES	10
2.4. COLLECTION DE MATERIEL BIOLOGIQUE	11
2.5. ACTIVITES D'EXPERTISE 2017	11
2.6. ACTIVITES DE SEQUENÇAGE.....	13
3. ACTIVITES DE SURVEILLANCE MICROBIOLOGIQUE DE LA LISTERIOSE EN FRANCE.....	14
3.1. DESCRIPTION DU RESEAU DE PARTENAIRES LABM	14
3.2. SURVEILLANCE DE L'EVOLUTION ET DES CARACTERISTIQUES DES INFECTIONS.....	14
3.3. CARACTERISATION DES SOUCHES D'ORIGINE NON HUMAINE REÇUES AU CNRL.....	25
3.4. SURVEILLANCE DE LA RESISTANCE AUX ANTI-INFECTIEUX.....	30
3.5. INTERFACE AVEC LES RESEAUX DE SURVEILLANCE NATIONAUX OU INTERNATIONAUX.....	32
3.6. ENQUETE OU ETUDES PONCTUELLES CONCOURANT A LA SURVEILLANCE	38
4. ENQUETES OU ETUDES PONCTUELLES CONCOURANT A LA SURVEILLANCE ET ALERTE.....	40
4.1. SUSPICIONS D'INFECTIONS NOSOCOMIALES	40
4.2. CLUSTERS CGMLST	40
4.3. EPIDEMIES.....	40
4.4. ALERTES-PRODUITS DGAL.....	41
4.5. ALERTES PRODUITS DGCCRF	43
4.6. ENQUETES DES FORMES NEUROMENINGEES (ENQUETES « FRIGO »).....	43
4.7. «URGENT INQUIRIES» DE L'ECDC.....	44
4.8. ENQUETE JUDICIAIRE	44
5. ACTIVITES DE RETRO-INFORMATION, DE FORMATION ET DE CONSEIL.....	45
5.1. CONSEIL ET EXPERTISE AUX PROFESSIONNELS DE SANTE	45
5.2. CONSEIL ET EXPERTISE AUX AUTORITES SANITAIRES	47
5.3. CONSEIL ET EXPERTISE POUR D'AUTRES CIBLES (MEDIAS, GRAND PUBLIC, ETC.).....	48
6. TRAVAUX DE RECHERCHE ET PUBLICATIONS EN LIEN DIRECT AVEC L'ACTIVITE DU CNRL.....	49
6.1. ACTIVITES DE RECHERCHE EN COURS EN 2017	49
6.2. LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS DE 2017.....	54
7. COOPERATION AVEC LES LABORATOIRES DE SANTE ANIMALE, D'HYGIENE ALIMENTAIRE, ENVIRONNEMENTAUX.....	57
7.1. COOPERATION	57
7.2. ECHANGES ENTRE LE CNR ET LE LNR.....	57
8. PROGRAMME D'ACTIVITE POUR LES ANNEES 2018-2019	58
9. REFERENCES.....	59
ANNEXE A : ORGANISATION DU CNR.....	63
A.1. MISSIONS DU CNR	63
A.2. PERSONNEL PERMANENT.....	64
A.2. LOCAUX	65

A.3. EQUIPEMENT.....	66
A.4. MAINTIEN, DETENTION ET DIFFUSION DE MATERIEL BIOLOGIQUE	67
A.5. MAINTIEN ET DETENTION DES BASES DE DONNEES DU CNRL.....	69
A.6. MANAGEMENT DE LA QUALITE ET HYGIENE/SECURITE AU SEIN DU CNRL.....	70
ANNEXE B : ACTIVITES D'EXPERTISE DU CNR <i>LISTERIA</i>.....	72
B.1. METHODES DE REFERENCES ET MARQUEURS EPIDEMIOLOGIQUES DISPONIBLES.....	72
B.2. TECHNIQUES RECOMMANDEES PAR LE CNRL.....	73

LISTE DES ABREVIATIONS ET ACRONYMES

Abréviation / Acronymes	Dénomination
ADN	Acide désoxyribonucléique
ANSES-LSA	Laboratoire de Santé animale de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
ANSM	Agence National de Sécurité du Médicament et des produits de santé
ARS	Agence Régionale de Santé
CES	Comité d'experts spécialisés
CCOMS	Centre Collaborateur de l'OMS des <i>Listeria monocytogenes</i>
CDC	Center for Diseases Control
CFU	Colonie Formant Unité
cgMLST	Core Genome Multi Locus Sequence Typing
CNRL	Centre National de Référence des <i>Listeria</i>
COM	Collectivité d'Outre-Mer
DG/DCCRF	Direction Générale / Départementale de la Consommation et de la Répression des Fraudes
DGAI	Direction Générale de l'Alimentation
DGS	Direction Générale de la Santé
DG SANTE	Direction Générale de la Santé et du Consommateur
DO	Déclaration Obligatoire
DROM-TOM	Département & Région et Territoire d'Outre-Mer
EFSA	European Food Safety Agency
ELITE	Epidemic Intelligence Information System
EHPAD	Etablissement d'Hébergement pour Personnes Agées Dépendantes
EQA	Essai d'intercomparaison – Essai externe de la qualité
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FWD	Food and Water-borne Diseases
GEA	Gastro-entérite aiguë
IIa	Sérovars 1/2a et 3a de <i>Lm</i>
IIb	Sérovars 1/2b, 3b et 7 de <i>Lm</i>
IIc	Sérovars 1/2c et 3c de <i>Lm</i>
IVb	Sérovars 4b, 4d et 4e de <i>Lm</i>
L	Sérovars 4a, 4ab et 4c de <i>Lm</i>
LABM	Laboratoire d'analyses de Biologie Médicale
LCR	Liquide Céphalo-Rachidien ou Liquide Cérébro-Spinal (LCS)
InVS	Institut de Veille Sanitaire
INSEE	Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques
ISOPOL	International Symposium On Problems Of Listeriosis
<i>Lm</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
LNRI	Laboratoire National de Référence des <i>Listeria monocytogenes</i>
MLST	Multi-Locus Sequence Typing
MN	Materno-néonatal(e)
N	Système nerveux central
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
PFGE	Electrophorèse en champs pulsé
S	Septicémie
SPF	Santé Publique France
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
ST	MLST sequence type (in French)
TESSy	European Surveillance System

1. MISSIONS ET ORGANISATION DU CNR

La Direction Générale de la Santé (DGS) a mis en place en 1982 la surveillance nationale de la listériose et créé le Centre National de Référence des *Listeria*, d'abord localisé à la Faculté de Médecine de Nantes, auquel a été adjoint en 1990 le CNR pour la lysotypie et le typage moléculaire situé à l'Institut Pasteur.

L'Institut Pasteur héberge depuis 1993 le Centre National de Référence *Listeria* (CNRL), également Centre Collaborateur OMS *Listeria* (CCOMS). L'Institut Pasteur coordonne l'activité des CNRs placés sous sa responsabilité, et héberge différentes unités de recherche travaillant sur *Listeria* et d'autres entéropathogènes, ainsi que des plateformes technologiques permettant un accès privilégié à un large panel de techniques à haut débit et de grande technicité.

Le CNRL est en contact avec plus de 625 biologistes français, ainsi que les laboratoires vétérinaires départementaux, la DGCCRF et les laboratoires privés d'hygiène des aliments (environ 240 correspondants).

En cas de crise sanitaire, le CNRL est en mesure de réceptionner des souches 24h/24h, 7j/7j, et pourrait bénéficier d'un renfort en personnel auprès de la cellule d'intervention d'urgence des risques biologiques (CIBU) de l'Institut Pasteur, dont des techniciens sont habilités aux méthodes du CNRL.

Les responsables du CNRL possèdent une expertise médicale clinique et microbiologique et une expertise en microbiologie alimentaire et sécurité sanitaire des aliments.

1.1. ORGANISATION ET EVOLUTIONS INTERVENUES EN 2017

Le CNRL assure les missions définies par le décret n° 2016-806 du 16 juin 2016 relatif aux centres nationaux de référence pour la lutte contre les maladies transmissibles et l'arrêté du 16 juin 2016 fixant le cahier des charges des Centres nationaux de référence pour la lutte contre les maladies transmissibles, complété par le cahier des charges spécifiques du CNR *Listeria* de Santé Publique France. L'arrêté du 7 mars 2017 fixe la liste des CNR pour la période du 1^{er} avril 2017 au 31 mars 2022.

L'ensemble de l'organisation du CNR est décrit en Annexes A et B de ce rapport. L'organigramme du CNRL est présenté en Figure 1.

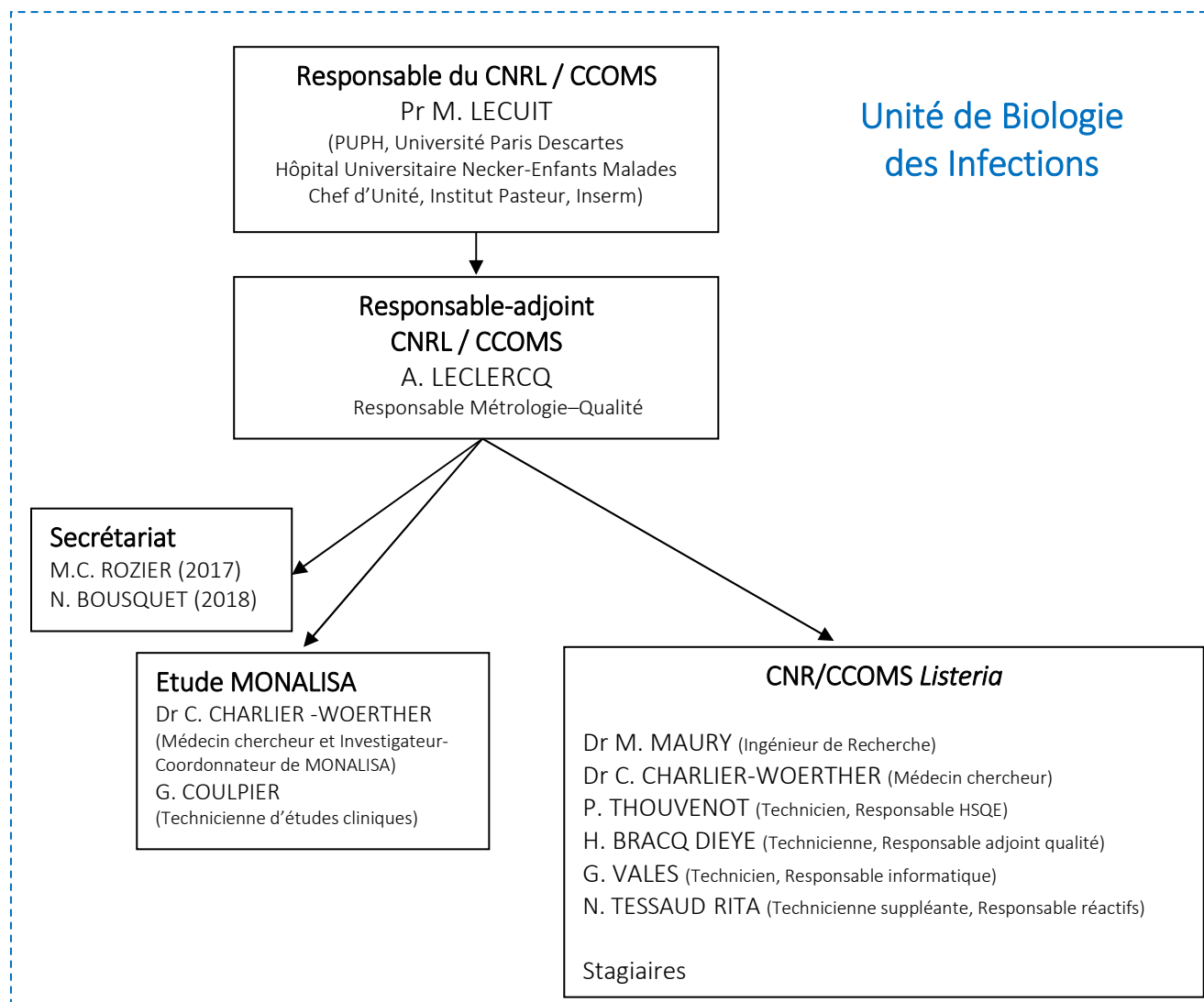
Depuis le 01 Janvier 2017, le cgMLST (core genome MultiLocus Sequence Typing) est la méthode de typage de référence pour la surveillance microbiologique de *Lm* en France.

1.2. ACCREDITATION

Le CNRL est accrédité depuis 2015 par le COFRAC selon la norme EN ISO 15189 (Attestation d'accréditation N°8-2588 disponible sur le site web du COFRAC) et fait partie du Laboratoire de Référence et d'Expertise Multisite (LRE-MS) de l'Institut Pasteur.

En Janvier 2017, le CNRL a été audité par le COFRAC d'un point de vue technique et management de la qualité sans écart relevé. Cette accréditation représente 50% de son activité à accréditer pour 2020 (Annexe B).

Figure 1. Organigramme du CNR des *Listeria*



2. ACTIVITES D'EXPERTISE

ELEMENTS CLES DE 2017

- Validation de l'identification des *Listeria* par la méthode de spectrométrie de masse (MS) MALDI-TOF (Bruker Diagnostics)
- Collection de 1519 nouvelles souches caractérisées de *Listeria*
- Délai moyen de restitution des résultats du CNR aux laboratoires de 4 jours
- 2150 souches séquencées de *Listeria* pour la surveillance microbiologique nationale des *Listeria*

La description des techniques disponibles au CNRL est décrite en Annexe B de ce rapport.

2.1. EVOLUTION DES TECHNIQUES

VALIDATION DE NOUVEAUX OUTILS DE DIAGNOSTIC

Identification des Listeria par spectrométrie de masse (MS) MALDI-TOF

Article: Thouvenot P, Vales G, Bracq-Dieye H, Tessaud-Rita N, Maury MM, Moura A, Lecuit M, Leclercq A. 2018. MALDI-TOF mass spectrometry-based identification of *Listeria* species in surveillance: A prospective study. *J Microbiol Methods* 144:29-32.

Abstract: This study aimed to evaluate MALDI-TOF MS for species discrimination of *Listeria* in the context of routine surveillance. MALDI-TOF MS yielded 100% accuracy for the identification of *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. fleischmannii*, *L. grayi*, *L. seeligeri*, *L. weihenstephanensis* and *L. welshimeri*, as confirmed by whole genome sequence analyses.

Le CNRL avait précédemment testé la méthode MALDI-TOF MS ANDROMAS (6) et est en contact avec bioMérieux, fabricant du système MALDI-TOF MS VITEK, pour connaître les caractéristiques de performance de cette méthode pour l'identification des *Listeria*.

2.2. TRAVAUX D'ÉVALUATION DES TECHNIQUES, REACTIFS ET TROUSSES

Dans le cadre de l'étude MONALISA, une bibliothèque a été constituée comportant des échantillons de plasma et de sérum pour plus de 1000 malades et 456 témoins (inclusions en cours), sur lesquels de futurs tests diagnostiques pourront être évalués.

Après consultation du réseau R2M des biologistes Français, les deux kits utilisés par la grande majorité des utilisateurs sont la PCR syndromique FILM ARRAY (bioMérieux, Marcy l'Etoile) pour les échantillons de sang et de LCR et le kit commercial de PCR monoplex RealCycler LIST-U/LIST-G (Orgentec SASU, Trappes).

Le CNRL a participé à un essai interlaboratoire international organisé par l'ADRIA QUIMPER pour la validation de la méthode Maldi-Tof MS Bruker Daltonics pour l'identification des *Listeria* avec le MALDI-BIOTYPER et pour un nouveau module de sous-typage des *Listeria* « subtyping module » afin d'en améliorer leur identification à l'espèce.

2.3. TECHNIQUES TRANSFEREES VERS D'AUTRES LABORATOIRES

En juin 2017, le CNRL a formé le laboratoire Cerballiance pour la technique de coproculture *Listeria monocytogenes* dans le cadre de l'investigation de l'alerte produit DGAI 2017/397 aux Internationaux de France de Tennis de Roland Garros, qui a permis à l'isolement d'une *L. monocytogenes* chez une personne ayant consommé des aliments contaminés.

Le CNRL a transféré en 2017 la méthode de typage cgMLST à des laboratoires étrangers et à une équipe de l'INRA souhaitant utiliser cette technique.

2.4. COLLECTION DE MATERIEL BIOLOGIQUE

Le CNRL possède deux collections inventoriées issues de son activité propre :

- celles des souches de référence qui a été complétée en 2017 avec l'espèce *L. costaricensis* (7);
- celles des souches de son activité en tant que CNR des *Listeria* qui a été complétée en 2017 de 1519 souches supplémentaires.

L'organisation, les conditions de stockage et de mise à disposition des collections de ces souches sont décrites dans l'annexe A. En 2018, l'inventaire de ces collections aujourd'hui effectué sous Excel sera migré vers le logiciel BRCLims.

En 2017, 650 souches d'alertes produits ont été transférées au LNR des *Listeria monocytogenes* (LNRI).

2.5. ACTIVITES D'EXPERTISE 2017

PIPELINE DE LA RECEPTION DES SOUCHES AU RENDU DE L'EXPERTISE MICROBIOLOGIQUE

Les souches réceptionnées et les analyses effectuées sont décrites dans le Tableau 1.

En 2017, le CNRL a reçu également 323 (2016 :202) souches isolées de patients ou d'aliments adressées par 7 laboratoires étrangers (Brésil, Costa Rica, Danemark, Iran, Nigeria, Portugal, Suisse) ou de produits importés pour expertise, dans le cadre de ses activités de Centre Collaborateur de l'OMS. Le CNRL a également reçu 261 souches d'origine environnementale et/ou alimentaire (262 en 2016 ; 279 en 2015) adressées par des laboratoires d'hygiène et de contrôle des aliments pour identification et caractérisation (prestations payantes), mais intégrées à la surveillance nationale tout en respectant la confidentialité des données sur les souches bien entendu à la disposition des autorités compétentes qui en feraient la demande officielle au CNRL.

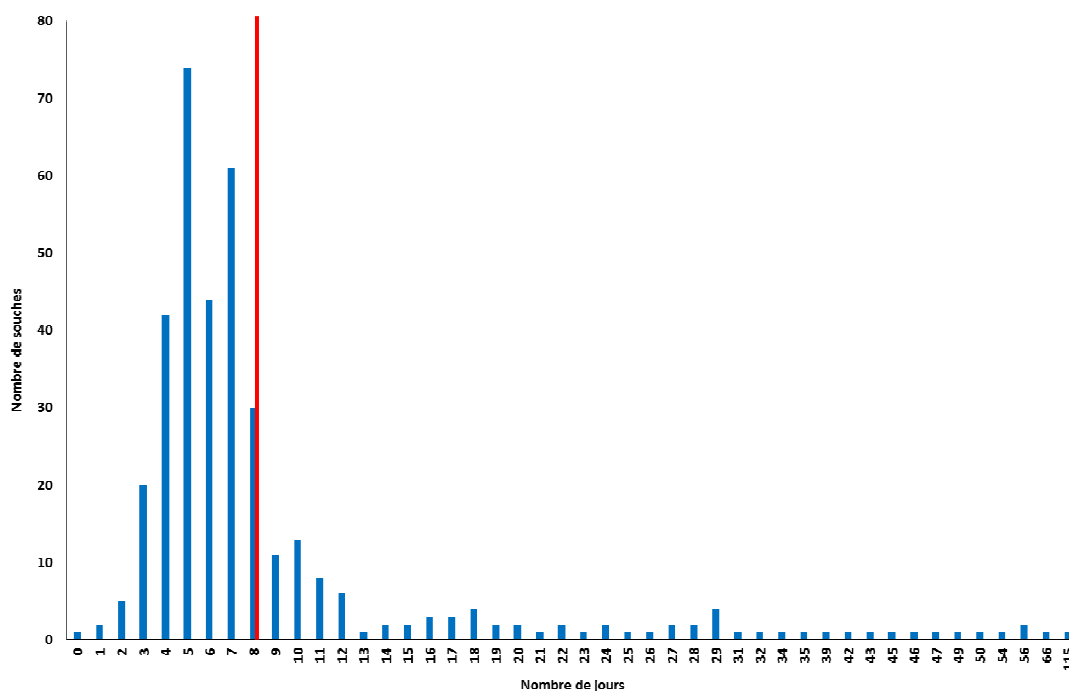
Tableau 1. Souches réceptionnées au CNRL en 2017 et analyses effectuées

Nombre de souches	Origine	Pourcentage de fiches de données réceptionnées	Provenance	Pays	Identification	PCR séro groupe	Antibiogramme	Séquençage et cgMLST
343	Humaines	100%	Centres Hospitaliers	France	100%	100%	100%	100%
49	Humaines	100%	Laboratoires Privés	France	100%	100%	100%	100%
1112	Alimentaires et environnementale (Surveillance)	100%	Laboratoires de Microbiologie alimentaire	France	100%	100%	0%	100%
261	Alimentaires et Environnementale (Autocontrôles privés intégrés à la surveillance nationale)	100%	Laboratoires de Microbiologie alimentaire	France	100%	100%	0%	100%
385	Humaines, Alimentaires et Environnementale (Investigation historique de clusters)	100%	CNRL	France	100%	100%	0%	100%
TOTAL 2150		100%			100%	100%	100% souches humaines	100%

Délai identification / réception

Le **délai moyen entre le prélèvement et la réception** des souches au CNRL est de 8 jours (Figure 2), comme en 2016. Les délais extrêmes s'expliquent par le délai entre déclaration obligatoire et réception de la souche au CNRL, malgré les relances effectuées par SPF.

Figure 2. Distribution des délais entre le prélèvement et la réception au CNRL pour les souches d'origine humaine réceptionnées en 2017 (médiane en rouge)



Non-conformité de souches

La détermination de l'espèce *L. monocytogenes* par les laboratoires d'analyse médicale (LABM) repose de manière croissante sur la méthode de spectrométrie de masse (MS) MALDI-TOF. En 2017, le CNRL a publié une évaluation de l'identification de l'espèce et du genre *Listeria* par la méthode avec le système Bruker Daltonics Microflex et BioTyper. Celle-ci est excellente à l'exception de certaines espèces de *Listeria* décrites depuis 2009, mais jamais isolées en clinique à ce jour (8). La spectrométrie de masse remplace depuis Aout 2016 la méthode API-*Listeria* (bioMérieux) comme méthode de détermination du genre et de l'espèce au CNRL.

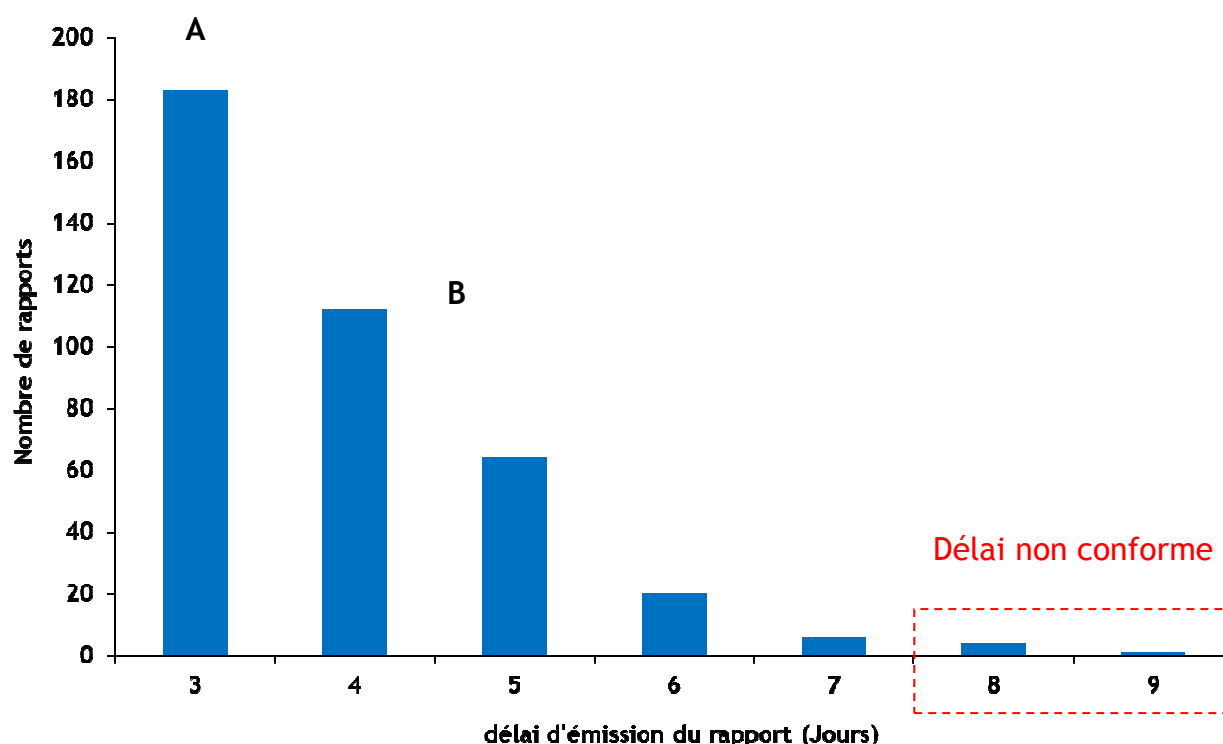
Parmi les souches qui nous ont été adressées en 2017, la détermination de l'espèce était correcte dans 99,7% des cas. 100% des souches humaines furent bien identifiées comme *L. monocytogenes*.

Envoi du rapport d'essai

Le **délai moyen entre réception de la souche au CNRL et l'envoi du rapport d'essai** (incluant l'identification de l'espèce et le groupage PCR) a été de 4 jours en 2017 (4,5 j en 2016) (Figure 3), ce qui correspond au délai cible du système qualité du CNRL (4 jours ouvrés). Le délai peut s'allonger si les souches nous sont adressées après le mercredi ou en cas de jours fériés, décalant la date d'obtention des résultats à la semaine suivante (+3 jours). Ce délai peut également s'allonger en cas de nécessité de purification de la souche ou de tests phénotypiques complémentaires reposant sur l'hydrolyse des sucres sur 5 jours.

Les délais non-conformes (3% des souches humaines) étaient tous liés à des difficultés de purification de souches, à des difficultés techniques ou à l'identification de bactéries non *Listeria*.

Figure 3. Distribution des délais entre la réception de la souche au CNRL et l'envoi du rapport d'essai pour les souches d'origine humaine réceptionnées en 2017 (A, rapports d'analyses sans week-end ; B, rapports d'analyses avec week-end et jours fériés)



2.6. ACTIVITES DE SEQUENÇAGE

En 2017 le CNRL a séquençé 2150 souches de *Listeria* dans le cadre de son activité continue de surveillance (n=1765) et d'études des investigations, clusters et épidémies (n=385) au niveau national, européen et international.

Le CNRL réalise l'extraction d'ADN génomique et le séquençage est effectué à la plateforme de microbiologie mutualisée (P2M) de l'Institut Pasteur (9), où sont actuellement effectués 2 séquençages par semaine (Mercredi/Vendredi), selon la technologie illumina. Les banques sont préparées avec le kit Nextera XT et séquencées par un équipement NextSeq 500. Le traitement des données sorties du séquenceur (reads) est traité automatiquement (sous la supervision d'un bioinformaticien du Centre de Bio-informatique, Bio-statistique et Biologie Intégrative (C3BI) de l'Institut Pasteur, Alexis Criscuolo) au moyen d'un script validé par le CNRL utilisant le logiciel SpAdes (St Petersburg genome assembler, <http://cab.spbu.ru/software/spades/>).

Ces assemblages, après passage du contrôle qualité, sont déposés chaque semaine dans la base BIGSdb *Listeria* (<http://bigsdbs.pasteur.fr/listeria/listeria.html>) puis les deux personnes du CNRL en charge de la surveillance A. Leclercq et M. Maury déterminent le type cgMLST de ces souches sur 1748 loci (10). Ces données sont ensuite colligées dans la base nationale de surveillance Française dans bioNumerics version 7.6 afin d'abonder les clusters connus et en détecter de nouveaux.

Ce pipeline de génomique appliqué à la surveillance nationale a été développé par un chercheur post-doctoral de l'Unité de Biologie des Infections en collaboration avec Sylvain Brisse (10). Cette méthode de typage a été validée pour la surveillance en France en collaboration avec SPF, et publiée en 2017 dans Moura A, Tourdjman M, Leclercq A, Hamelin E, Laurent E, Fredriksen N, Van Cauteren D, Bracq-Dieye H, Thouvenot P, Vales G, Tessaud-Rita N, Maury MM, Alexandru A, Criscuolo A, Quevillon E, Donguy MP, Enouf V, de Valk H, Brisse S, Lecuit M. 2017. Real-Time Whole-Genome Sequencing for Surveillance of *Listeria monocytogenes*, France. *Emerg Infect Dis* 23:1462-1470.

3. ACTIVITES DE SURVEILLANCE MICROBIOLOGIQUE DE LA LISTERIOSE EN FRANCE

ELEMENTS CLES DE 2017

- Taux d'exhaustivité de réception des souches humaines de 98% et des souches d'alertes produits de 73%
- Nombre de cas de listériose stable
- Age médian des cas en augmentation, de 71 à 76 ans
- Passage en routine depuis le 1^{er} Janvier 2017 à la méthode de typage génomique cgMLST et confirmation de son pouvoir de discrimination accru par rapport à la PFGE
- Structure de la population des souches de *Listeria monocytogenes* françaises stable par rapport à 2016

3.1. DESCRIPTION DU RESEAU DE PARTENAIRES LABM

Les laboratoires expéditeurs des souches cliniques (n=370) sont à 87% (84% en 2016) hospitaliers, reflétant la sévérité de l'infection. Les autres structures sont des laboratoires privés 13% (16% en 2016). La listériose étant une maladie à déclaration obligatoire, le réseau du CNRL couvre le territoire français.

3.2. SURVEILLANCE DE L'EVOLUTION ET DES CARACTERISTIQUES DES INFECTIONS

3.2.1. Définition des cas

En France

Les cas de listériose humaine sont classés en listériose materno-néonatale et listériose non materno-néonatale, selon les critères suivants :

- Un cas de **listériose materno-néonatale** est un cas où *Lm* est isolée d'une culture d'un site, le plus souvent physiologiquement stérile, chez la femme enceinte, le fœtus, des prélèvements périnataux ou du nouveau-né (≤ 28 jours). La mère et son enfant comptent pour un cas.
- Un cas de **listériose non materno-néonatale** est un cas où une souche de *Lm* est isolée d'un site, le plus souvent physiologiquement stérile, chez un sujet de plus de 28 jours (femme enceinte exclue). Il peut s'agir :
 - d'une **forme septicémique (S)** définie par la présence de *Lm* dans une hémoculture, en l'absence d'argument pour une atteinte neurologique ;
 - d'une **forme neurologique (N)** définie par la présence de *Lm* dans la culture d'un liquide céphalo-rachidien (LCR), dans le contenu d'un abcès cérébral, ou dans une hémoculture chez un patient avec atteinte neurologique clinique ou neuroradiologique (sans diagnostic alternatif) ;
 - d'une **autre forme (A)** définie par la présence de *Lm* dans un prélèvement non-fécal et non-sanguin, materno-fœtal ou cérébral.

On distingue les cas sporadiques et les cas groupés. Les cas groupés (dus à des souches présentant les mêmes caractéristiques microbiologiques) constituent une épidémie avérée lorsque la source de contamination alimentaire est identifiée.

Le système de surveillance de la listériose du CNRL se fonde sur l'étude des souches adressées volontairement par les biologistes. Il s'agit donc d'un système passif. Le nombre d'isolats reçus au CNRL est très voisin du nombre de cas déclarés dans le cadre de la déclaration obligatoire, démontrant la quasi-exhaustivité du recueil des souches cliniques des cas déclarés. Le bilan présenté concerne tous les cas pour lesquels un prélèvement positif à *L. monocytogenes* a été effectué en 2017 avec une souche reçue et caractérisée par le CNRL. Ceci inclut également des souches reçues au CNRL au cours du premier trimestre 2018 pour des cas déclarés en 2017, compte tenu des délais d'acheminement des souches après la déclaration.

Proposition de modification en Europe

En Juin 2017, l'ECDC a demandé à la Commission Européenne SANTE C3 un amendement (Implementing act to the Decision 1082/13) de la liste des « EU/EEA reportable diseases » et de leurs définitions pour amender la définition européenne des cas de listériose en incluant la détection d'acides nucléiques de *L. monocytogenes* comme alternative à l'isolement par une méthode par culture.

En 2018, un outil de notification au CNRL des PCR *Listeria* positive sans isolement de souches sera mis en place dans le cadre de l'appel d'offre pour le changement du LIMS de gestion du CNRL.

3.2.2. Analyse globale des cas de listériose

Nombre total de cas

En 2017, le CNRL a reçu 397 souches humaines (407 en 2016) liées à 372 suspicions d'infections humaines déclarées (363 en 2016). La différence observée entre nombres de souches et de cas est liée à l'existence de doublons voire triplicats de souches (n=27) par patient, et donc non pris en compte dans l'analyse finale.

Le CNR a investigué 1 selle dans le cadre du programme R-GNOSIS et 1 selle dans le cadre de la transplantation fécale, sans isolement de *L. monocytogenes* viables.

Un cas de listériose à *L. ivanovii* subsp. *ivanovii* isolée lors d'une appendicite aiguë chez un enfant de 7 ans a été confirmé en 2017.

Un autre cas a eu un second épisode de listériose à *L. monocytogenes*, après un premier épisode en 2016. Ces deux épisodes étaient causés par des souches différentes (Groupe PCR IIb ; cgMLST Type en 2016 : CT1715, en 2017 : CT1295).

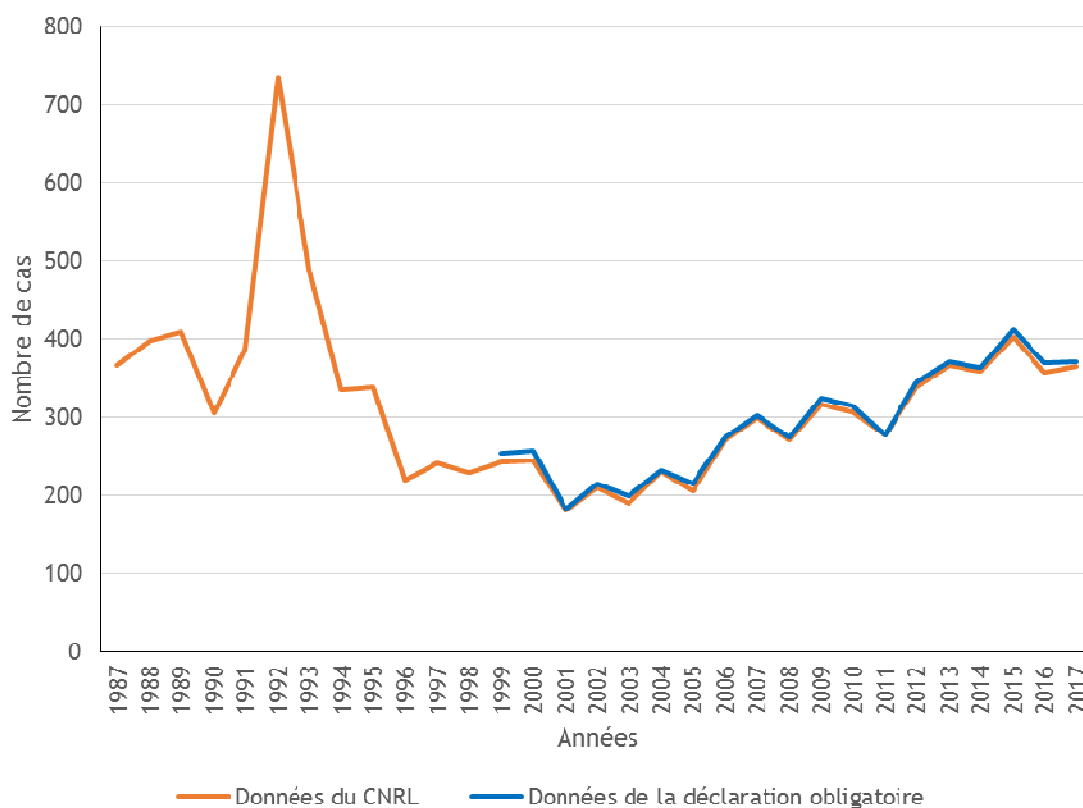
Pour 2017, le CNRL retient donc, après recoupement des données de SPF, 365 cas de listériose à *Listeria monocytogenes* (363 en 2016, soit une augmentation de 1%) au jour du traitement statistique de ce rapport. La différence de 7 cas par rapport aux données de SPF est due à : 3 cas sans souche associée à la DO (car non conservées par les laboratoires) ; 3 cas où seule la qPCR sur le LCR était positive, sans souche isolée ; 1 cas diagnostiqué par culture, mais dont la souche envoyée au CNRL n'était pas cultivable. Il y a eu 353 cas (+1 cas à *L. ivanovii* subsp. *ivanovii*) en France métropolitaine et 11 dans les DOM-TOM.

L'incidence de la listériose depuis 1992 en France a suivi l'évolution suivante :

- Diminution importante dans les années 1990 de 700 à environ 400 cas par an.
- Augmentation progressive depuis 2006 sans cause unique identifiée (Figure 4) (11).

L'incidence de la listériose humaine est de 5,4 cas par million d'habitants en 2017 (2016 : 5,6 cas par million d'habitants). Elle est similaire à celle notée en 2013, 2014 et 2016 et légèrement plus faible qu'en 2015, où l'incidence observée était la plus élevée depuis la mise en place du système de surveillance français : 6,2 cas par millions d'habitants.

Figure 4. Nombre de cas recensés en France métropolitaine par le CNRL et par la Déclaration Obligatoire (Source : SPF) entre 1987 et 2017



Taux d'exhaustivité

La surveillance de la listériose en France se fonde sur le recoupement de 2 sources complémentaires recensant les cas : la notification aux ARS (Déclaration Obligatoire) et l'envoi volontaire des souches par les microbiologistes au CNRL.

Le taux d'exhaustivité de réception des souches par rapport à l'ensemble des cas recensés est de 98% en 2017 (96,5% en 2016) (Figure 4). Parmi les systèmes de surveillance européens de la listériose, la France présente l'un des taux d'exhaustivité les plus élevés, rendant possible des analyses épidémiologiques et microbiologiques de qualité.

NB. Les données de Santé Publique France obtenues par technique de capture / recapture sur les systèmes de surveillance de la listériose et Epibac (surveillance des infections invasives) de 2008 à 2013 a permis d'évaluer l'exhaustivité de la déclaration obligatoire de la listériose en France entre 85 et 87% (12).

Cas de listériose dans les DROM-TOM-COM

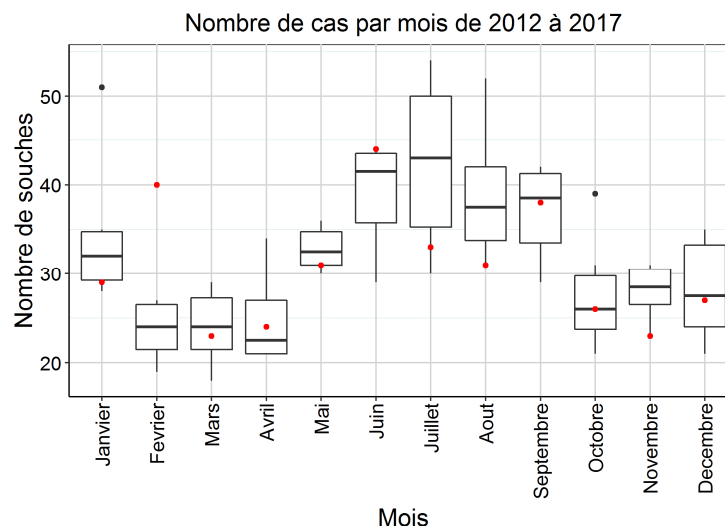
En 2017, 11 cas sporadiques de listériose ont été identifiés dans les DROM-TOM-COM : 6 dans l'île de la Réunion, DROM-TOM-COM le plus peuplé (4 formes bactériémiques, 1 forme materno-néonatale et 1 forme neuroméningée), 3 cas en Martinique (2 formes bactériémiques et 1 forme neuroméningée) et 2 cas en Guadeloupe (formes bactériémiques).

Distribution temporelle des cas métropolitains

Le nombre mensuel de cas sporadiques observés de 2012 à 2017 est présenté dans la Figure 5.

En 2017, les mois où le plus grand nombre des cas ont été notifiés sont Février et Juin (Figure 5), ne reflétant pas la saisonnalité habituelle des cas en France. Les raisons de cette saisonnalité ne sont pas clairement identifiées.

Figure 5. Distribution mensuelle des cas sporadiques de listériose en France métropolitaine entre 2012 et 2017 (Le point rouge indique le nombre de cas pour 2017).



Distribution géographique

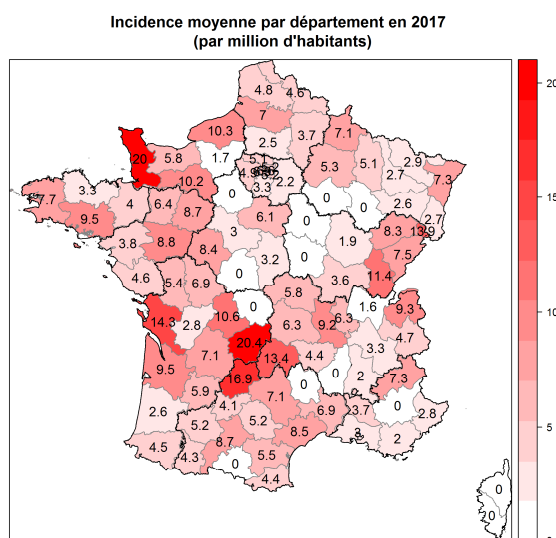
La distribution géographique des cas par département est présentée dans la Figure 6.

Les chiffres d'incidence sont exprimés en nombres de cas par 10^6 d'habitants par département et ont été calculés à partir des données démographiques établies par l'INSEE.

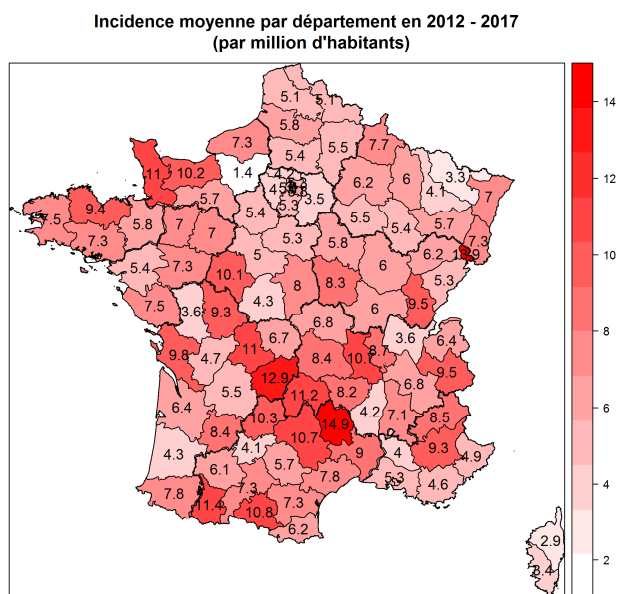
L'incidence régionale de la listériose est plus élevée dans l'ouest de la France (sud de la France en 2016). En 2017, l'incidence de la listériose était la plus élevée dans les départements de la Corrèze, du Lot, de la Manche, de Charente-Maritime et du Cantal.

Figure 6. Incidences départementales des cas de listériose en 2017 (A) et de 2012 à 2017 (B) (Incidence par 10^6 d'habitants par département).

A



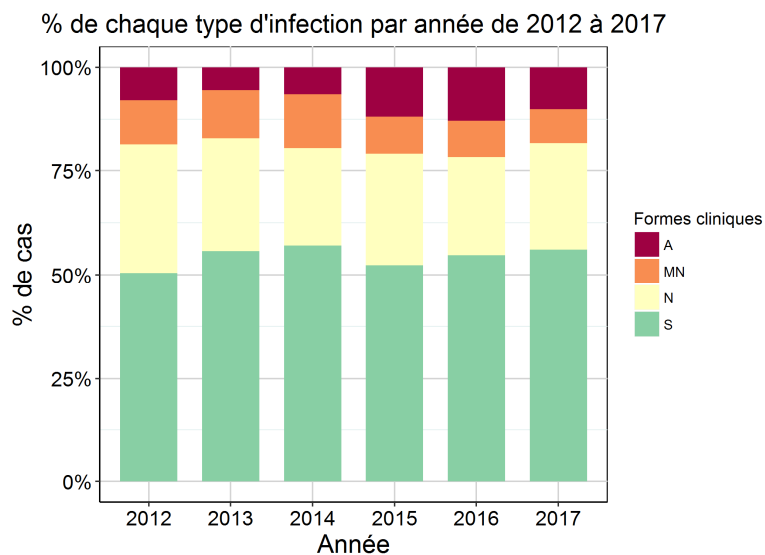
B



3.2.3. Analyse par forme clinique

La distribution des types d'infection est stable depuis 2012, avec une prédominance des formes septicémiques ($\geq 50\%$), puis neurologiques, et enfin des autres formes invasives et des formes materno-néonatales (Figure 7).

Figure 7. Distribution des cas sporadiques de listériose survenus en France métropolitaine depuis 2012 par forme clinique et par année.



Formes materno-néonatales

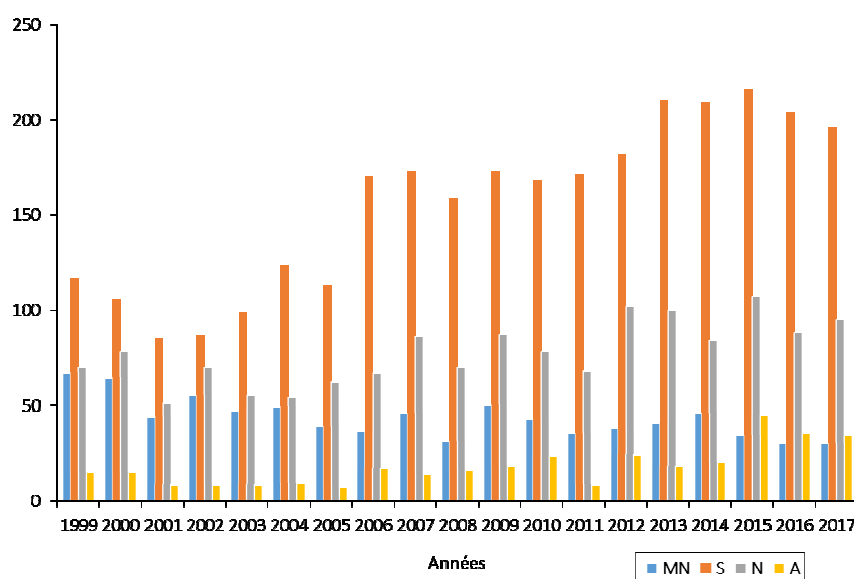
En 2017, 30 formes MN ont été enregistrées (2016 : 30), représentant 8,5% du nombre total de cas (2016 : 8,4%) comme en 2016. En 2017, l'incidence des formes MN était de 3,9 pour 100.000 naissances vivantes (2016 : 4,9), l'une des plus faibles enregistrées depuis 2006. Le nombre de cas MN a diminué de 51% entre 1999 et 2008, puis s'est stabilisé depuis autour de 35 à 40 cas par an (représentant 8 à 15% du total des cas ; Figure 8). Cette diminution est consécutive et donc possiblement la conséquence des campagnes de recommandations alimentaires destinées aux femmes enceintes.

L'étude prospective MONALISA a mis en évidence une incidence plus élevée de listériose MN au sein des populations originaires d'Afrique sub-saharienne ou du Maghreb (33% des patientes versus 11% des femmes enceintes en France, selon les données INSEE de la même période) (1). Les déterminants de ce déséquilibre ne sont pas connus [lien avec une situation socio-économique défavorisée, comme en Grande-Bretagne (13) et/ou une consommation accrue d'aliments à risque, comme au sein des minorités d'origine Mexicaine aux USA (14)]. **Ceci pourrait justifier des actions ciblées vers ces populations pour améliorer encore la prévention de la listériose.**

Formes non materno-néonatales

En 2017, 323 formes non materno-néonatales ont été enregistrées (327 en 2016), soit 92 % du total des cas sporadiques comme en 2016. Elles se répartissent en 196 formes septicémiques, 95 formes neurologiques et 32 autres formes. La Figure 8 indique leur répartition.

Figure 8. Evolution de la répartition des formes cliniques par année, depuis 1999.



Le Tableau 2 décrit la répartition des infections invasives classées comme « autres formes » de 2006 à 2017. 2 formes cutanées ont été rapportées dont une sur prothèse mammaire. Deux cas liés à des dialyses péritonéales ont fait évoquer une possible contamination de dispositifs médicaux, qui n'a pas été confirmée. Le CNRL a investigué une souche de *Lm* génosérogroupe IIa isolée d'une poche de plaquettes prélevées sur un donneur asymptomatique.

Les infections ostéoarticulaires, biliaires et urinaires ont fait l'objet d'analyses spécifiques dont les résultats ont été publiés (5, 15, 16), ou sont sous presse (infections pleuro-pulmonaires). Une revue sur les formes oculaires avec l'ECDC et intégrant les cas survenus en France depuis 1987 a été publiée en Janvier 2017 (17).

Terrain des formes non materno-néonatales. Des renseignements cliniques transmis par le biologiste accompagnent chaque souche à leur réception au CNRL. Ces données étaient renseignées dans 92% des cas en 2017 (2015 et 2016 : 92%). Dans 50% des cas renseignés en 2017, une ou plusieurs pathologies sous-jacentes étaient rapportées : cancer, cirrhose, éthylisme, diabète, dialyse, infection par le VIH, transplantation d'organe ou traitement immunosuppresseur (18) (54-56% de 2011 à 2016). Les comorbidités des patients avec listériose ont été analysées en détail dans le cadre de l'étude MONALISA (1).

Tableau 2. Répartition des autres formes de listériose de 2006 à 2017

Autres formes	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	Total
Vasculaire	1	4	0	1	0	2	1	1	1	2	3	4	20
Adénopathie	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	5
Endocardite	2	0	0	1	0	0	0	1	2	2	3	0	11
Os/articulaire	4	3	8	7	4	2	5	6	8	18	12	4	81
Digestive	0	1	0	0	1	1	3	1	1	3	1	0	12
Foie	1	0	2	2	1	0	0	0	0	2	1	1	10
Cédème	1	1	2	2	6	0	0	0	0	0	0	0	12
Erysipèle	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Infection d'ascite	5	3	6	3	10	3	12	7	4	9	8	15	85
Infection urinaire	0	0	0	1	1	0	2	0	0	0	1	0	5
Pneumopathie	0	0	1	1	2	1	3	1	3	3	3	2	20
Prostatite	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Infection oculaire	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	1	4
Infection cutanée	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2	2	7
Abcès	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	3
Fièvre/Céphalées	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2
Total	16	12	19	19	26	9	27	18	20	45	36	32	279

Age et répartition par sexe des patients avec listériose non materno-néonatale :

L'âge moyen des patients avec forme non-MN est de 69 ans en 2017 (2016 : 76 ans), avec une médiane de 76 ans (0 à 98 ans ; versus 71 ans en 2016 et 62 ans en 1999). Cette tendance est corrélée à l'allongement de la durée de vie observée dans la population française (<https://www.insee.fr/fr/statistiques/1906664?sommaire=1906743>), mais aussi l'amélioration de la prise en charge médicale des patients de plus en plus âgés. (Figure 9).

La distribution par classe d'âge des cas non materno-néonataux montre la rareté des cas dans la classe d'âge 1-44 ans (Figure 10).

Parmi les sujets de plus de 60 ans, on note également une répartition bimodale des cas : patients âgés d'environ 65 ans et d'environ 75 ans. Les données de l'étude observationnelle MONALISA permettent de suggérer que ces patients présentent des caractéristiques différentes : patients âgés avec comorbidités liées à l'âge, et patients moins âgés, mais porteurs de comorbidités immunosuppressives (2).

Figure 9. Box plot des souches réceptionnées de 2012 à 2018 selon les formes cliniques et l'âge du patient. En rouge, les cas de 2017.

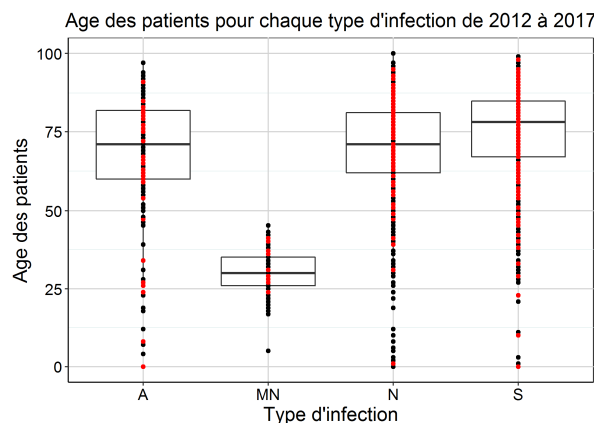
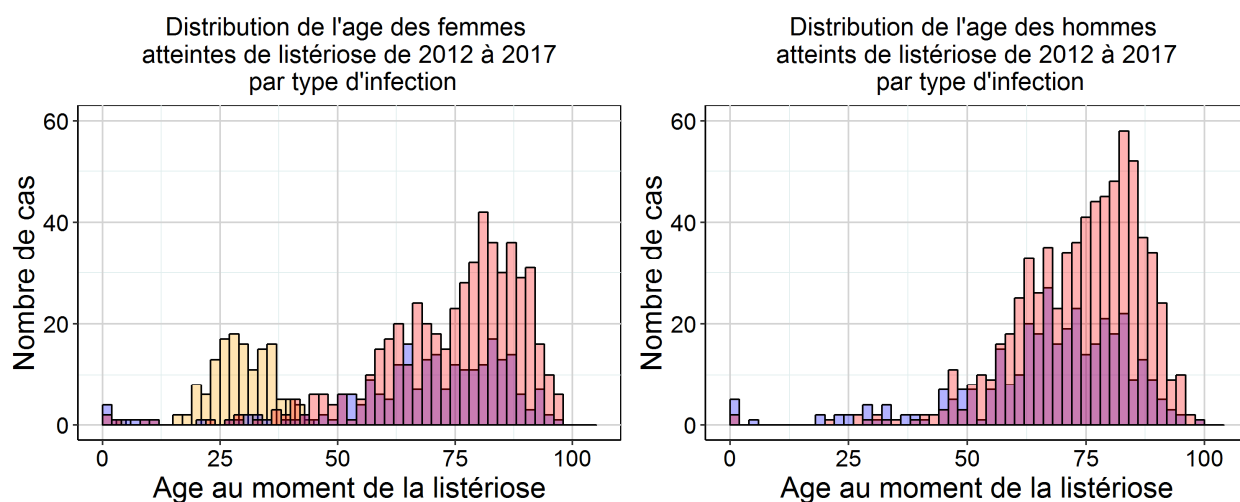
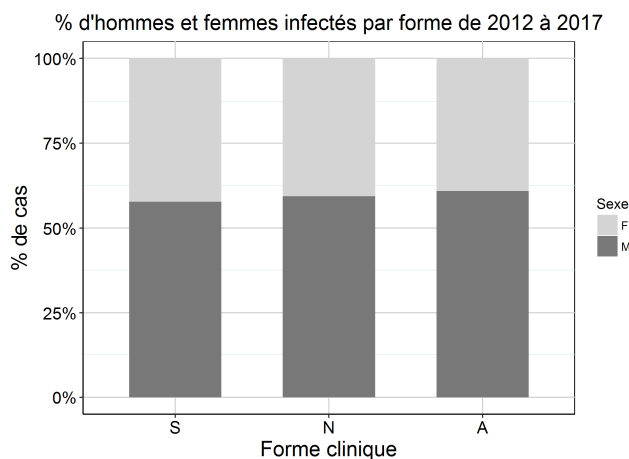


Figure 10. Distribution de l'âge des patients atteints de listériose entre 2012 et 2017 selon le sexe et le type d'infection. En jaune, les formes materno-néonatales. En rouge, les septicémies. En bleu, les formes neuroméningées. En violet, la superposition entre les formes septicémiques et des formes neuroméningées.



La distribution par sexe montre un excès significatif d'hommes par rapport au sexe-ratio attendu dans cette classe d'âge (Figure 11). Le sexe-ratio M/F était ainsi de 1,3 en 2017 comme en 2016 (avec 62 % d'hommes (2011-2015 : 59%)). Cette prédominance masculine des formes non-MN est constatée dans d'autres pays occidentaux (14, 19), et reste inexpliquée (différences d'exposition alimentaire ? prédisposition génétique liée au sexe ?).

Figure 11. Répartition du sexe selon les formes cliniques S, N et A de 2012 à 2017



3.2.4. Analyse microbiologique

Analyse par groupe PCR ou séro groupe PCR

Analyse générale

Les distributions par groupe PCR et par année des souches d'origine humaine isolées de 2006 à 2017 en France métropolitaine sont présentées dans le Tableau 3 et Figure 12.

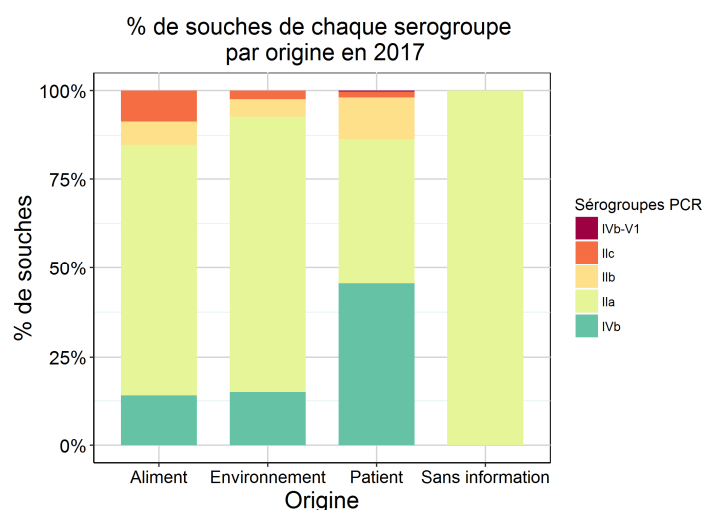
Le groupe PCR majoritaire des souches humaines isolées était le groupe PCR IVb comme en 2016. Il représente 47% des souches, suivi du groupe PCR IIa (39%), IIb (12%), puis IIc (2%). Depuis 2006, cette distribution est stable, et diffère de celle observée pour les souches alimentaires, pour lesquelles le groupe PCR IIa est majoritaire (70%) (Figure 12).

Un cas humain dû une souche appartenant au variant v1 du Groupe PCR IVb a été identifié, comme en 2016; il s'agit du sixième identifié en France. Cependant les souches de ce variant IVb-v1 (20) sont de cgMLST différents et ne traduisent pas l'émergence d'un nouveau clone (9, 10).

Tableau 3. Répartition des groupes PCR par année depuis 2006

Groupe PCR	Souches du sérovar	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017
IIa	1/2a ou 3a	79 (29%)	90 (30%)	89 (33%)	88 (28%)	100 (34%)	85 (31%)	98 (29%)	135 (37%)	137 (38%)	129 (32%)	126 (35%)	138 (39%)
IIb	1/2b, 3b ou 7	47 (17%)	45 (15%)	27 (10%)	47 (14%)	40 (13%)	40 (14%)	43 (13%)	32 (9%)	39 (11%)	65 (16%)	45 (13%)	42 (12%)
IIc	1/2c ou 3c	11 (4%)	14 (5%)	11 (4%)	24 (8%)	5 (2%)	6 (2%)	12 (3%)	12 (3%)	9 (3%)	10 (3%)	9 (3%)	6 (2%)
IVb (+ IVbv1)	4b, 4d ou 4e	133+1 (50%)	151+2 (50%)	141 (53%)	159 (50%)	153 (51%)	146 (53%)	185 (55%)	182+2 (51%)	172+2 (48%)	198 (49%)	176+1 (49%)	166+1 (47%)
L	4ab ou 4c ou 4a	0 (0%)	1 (<1%)	0 (0%)	1 (<1%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (*)
Total		271	303	268	319	298	277	338	363	359	402	357	353

Figure 12. Répartition des sérogroupes PCR par origine



La distribution mensuelle des principaux groupes PCR ne met pas en évidence de saisonnalité ou de disparité géographique.

Distribution des groupes PCR selon la forme clinique

Depuis 2006, les souches des groupes PCR IVb et IIa sont les plus fréquentes parmi les isolats cliniques, quel que soit le type d'infection (Tableau 4 et Figure 13). Le séro-groupe IVb est impliqué dans 47% des cas au total, et dans 63% des cas MN et 43% des cas N (Tableau 4). Le groupe PCR IIc n'est en revanche que très rarement responsable de listérioses humaines, en particulier pour les formes materno-néonatales et neurologiques. Il est à noter que la grande majorité des souches IIc expriment une internaline (IIa) tronquée (21-23). Il n'y a pas de corrélation entre l'âge du patient et le groupe PCR.

Tableau 4. Répartition des groupes PCR des souches selon les formes cliniques en 2017

	Materno-néonatale	Septicémie	Infections du système nerveux central	Autres formes	Total
IIa	5	81	34	18	138 (39%)
IIb	6	27	7	2	42 (12%)
IIc	0	3	2	1	6 (2%)
IVb (+ IVbv1)	19	84+1	52	11	166+1 (47%)
L	0	0	0	0	0
Total	30	196	95	32	353

Analyse MLST

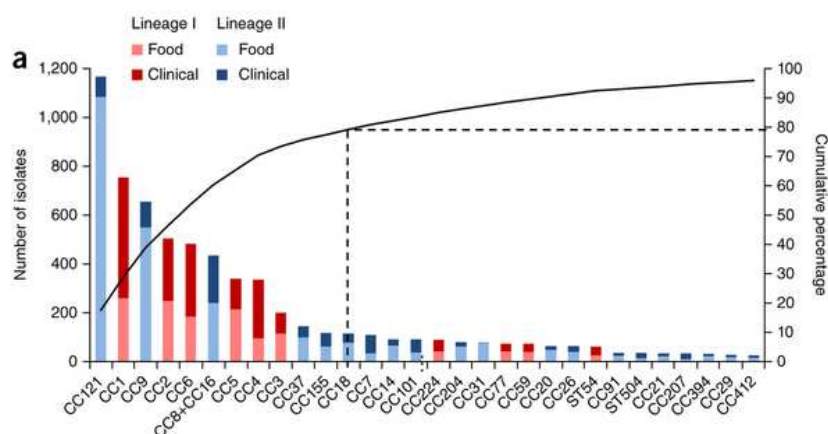
Grâce à l'utilisation d'un dictionnaire PFGE/MLST établi par le CNR, le clone MLST de toutes les souches analysées par PFGE a pu être déterminé. Ceci nous a permis d'étudier la prévalence et la distribution des clones MLST dans les échantillons cliniques et alimentaires depuis 2005 (23).

Aspect général

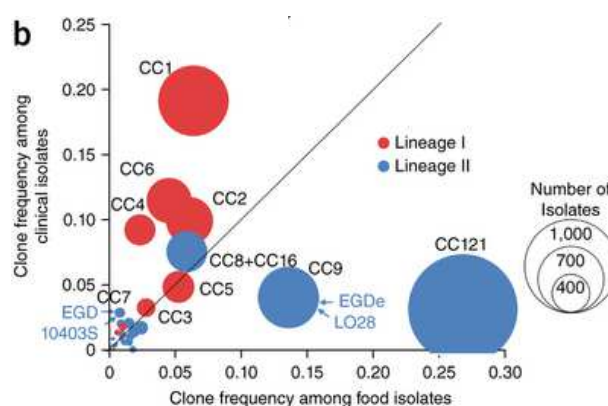
La prévalence et la distribution des clones MLST dans les échantillons cliniques et alimentaires ont été étudiées sur 6633 isolats collectés de manière exhaustive par le CNRL entre 2005 et 2013 (23).

Cette étude a démontré l'existence de 12 clones MLST majeurs chez *Lm*, qui représentent près de 80% des souches cliniques et alimentaires (Figure 13). Les clones CC1, CC2, CC4 et CC6 sont significativement plus fréquemment identifiés dans des échantillons cliniques que dans des échantillons alimentaires, alors que les clones CC9 et CC121 sont significativement associés à une origine alimentaire. Le complexe clonal CC1 est essentiellement associé aux formes neurologiques, les clones CC1, CC2 et CC4 aux formes materno-néonatales et les clones CC8+CC16, CC9 ainsi que CC121 aux formes septicémiques. Cette étude, en utilisant certaines données de l'étude MONALISA, a également montré que les clones CC1, CC2, CC4 et CC6 infectent des individus faiblement ou non immunodéprimés plus facilement que les autres clones, alors que les clones CC9 et CC121 sont plus souvent isolés de patients très immunodéprimés. L'ensemble de ces résultats, combinés à des tests de virulence *in vivo*, a permis de montrer que les clones CC1, CC2, CC4 et CC6 sont hypervirulents, alors que les clones CC9 et CC121 sont hypovirulents (23).

Figure 13. Prévalence et distribution des clones MLST de *Lm* dans les sources clinique et alimentaire d'isolement (Maury, Tsai *et al.*, 2016). Seuls les clones avec plus de 10 isolats sont représentés. (a) Prévalence des clones MLST de *Lm*. La courbe représente le pourcentage cumulatif d'isolats des différents clones, les clones étant ordonnés par nombre d'isolats et (b) Fréquence des clones au sein des isolats alimentaires (axe des X) et les isolats cliniques (axe des Y). La taille des cercles est proportionnelle au nombre d'isolats. Les positions des souches de référence sont indiquées.



Source : Maury, Tsai *et al.*, 2016



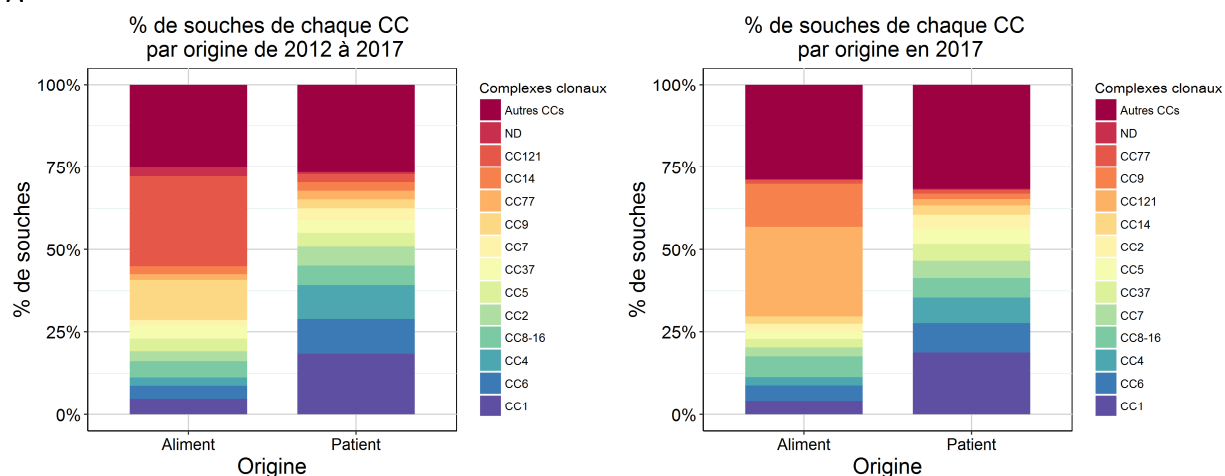
Source : Maury, Tsai *et al.*, 2016

Pour permettre une identification rapide des clones MLST majeurs, le CNRL, en collaboration avec le groupe de S. Brisse, a mis au point un ensemble de 3 PCR multiplexes permettant l'identification des 11 clones MLST les plus fréquents dans les échantillons cliniques et alimentaires, incluant les clones hyper- et hypo- virulents (24). Cette méthode plus rapide et moins coûteuse que la méthode MLST classique, est plus accessible aux laboratoires désirant identifier le clone MLST de leurs souches et d'en déduire une estimation de leur potentiel infectieux.

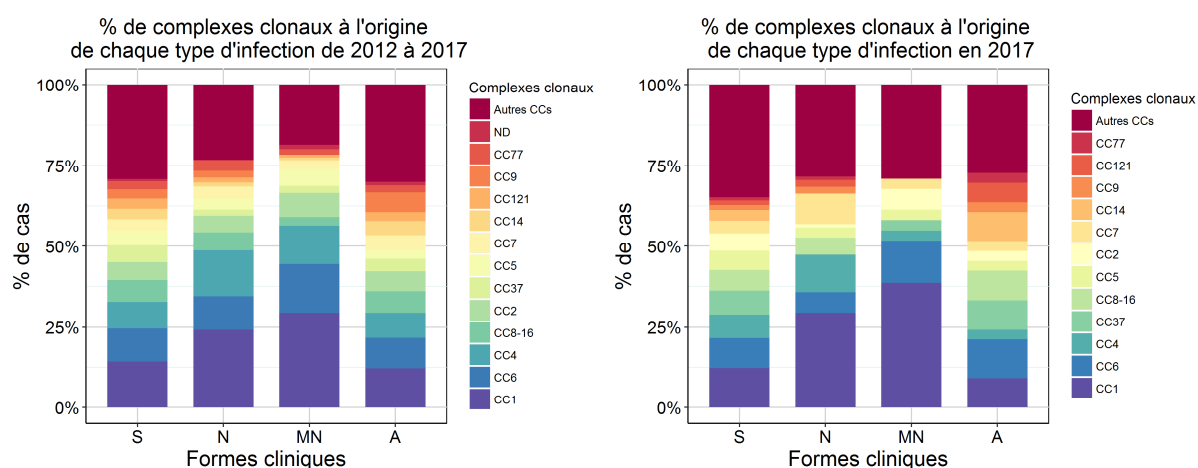
La Figure 14 montre la distribution, par formes cliniques, des différents clones des isolats cliniques collectés de 2012 à 2017. Elle montre une grande diversité des clones impliqués dans les infections cliniques, avec la prédominance des clones hypervirulents (CC1, 2, 4 et 6) dans les infections neurologiques et materno-néonatales (23).

Figure 14. Distribution des clones MLST par origines et types d'infection pour les isolats collectés de 2012 à 2017. (A) Distribution par origines. (B) Distribution par types d'infection. Les clones les plus fréquents sont représentés.

A



B



Analyse génomique par cgMLST

Cette analyse réalisée par le CNRL et SPF se trouve au point 4.2. de ce rapport.

3.3. CARACTERISATION DES SOUCHES D'ORIGINE NON HUMAINE REÇUES AU CNRL

Les souches isolées lors de contrôles sanitaires (dépassements du critère microbiologique de sécurité déclenchant une alerte produit auprès de la Direction Générale de l'Alimentation (DGAI) et de la Répression des Fraudes (DGCCRF) en fonction du type d'aliment concerné, et d'investigations autour de cas humain) sont systématiquement adressées au CNRL. Chaque professionnel de l'industrie agroalimentaire (laboratoires privés ou publics) peut également, dans le cadre d'autocontrôles, envoyer ses souches pour caractérisation au CNRL ou au Laboratoire National de Référence de *Lm* (LNRI) de l'ANSES à Maisons-Alfort. Le LNRI reçoit également les souches des plans annuels de surveillance et de contrôle de *Lm* conduits par la DGAI, afin d'estimer le niveau de contamination d'aliments de différentes filières. Le CNRL reçoit enfin des souches alimentaires dans le cadre de contre-expertises diligentées par les assureurs pour confirmation de résultats de caractérisation.

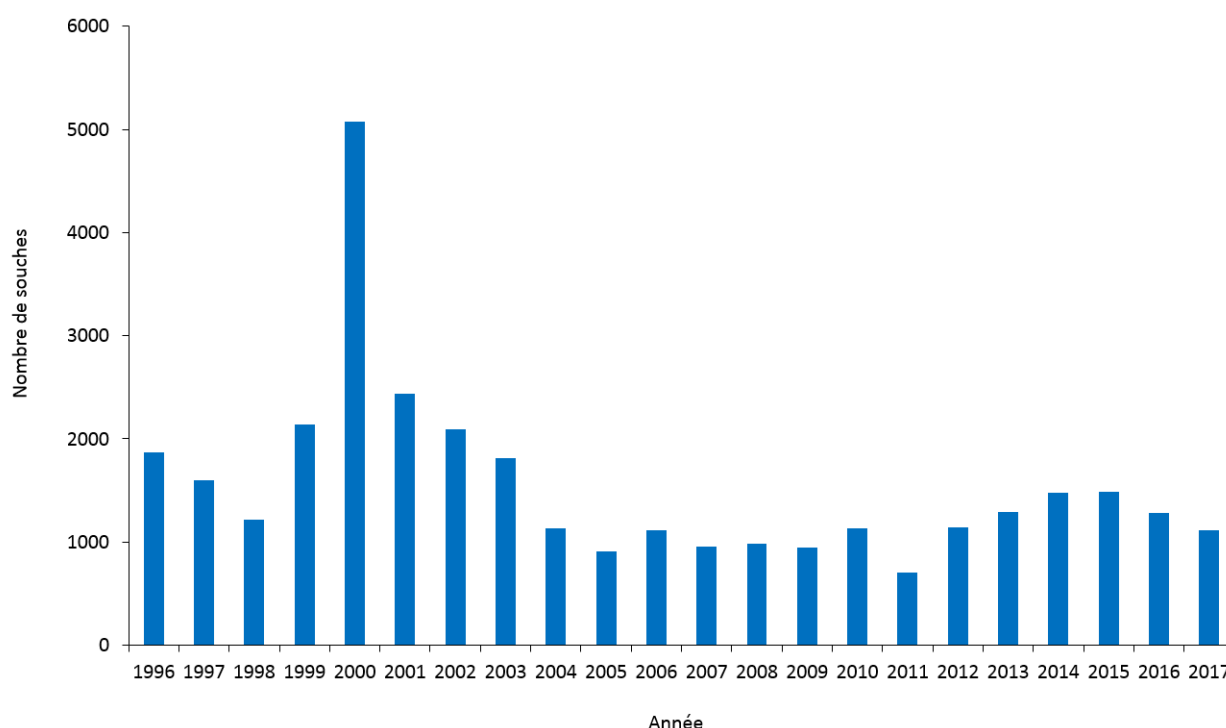
Analyse générale

Cette activité consiste à caractériser les souches isolées d'aliments ou de l'environnement agroalimentaire envoyées au CNRL pour :

- participer au plan de maîtrise des opérateurs agroalimentaires concernant *Listeria monocytogenes* en confirmant les résultats des autocontrôles et en caractérisant les souches,
- participer à l'identification du véhicule alimentaire en cas de cluster cgMLST, de cas groupés ou en début d'épidémie,
- comparer les souches cliniques aux souches alimentaires et identifier leurs caractéristiques respectives,
- constituer une banque de données pour mener les investigations lors de dépassement de seuil ou en début d'épidémie.

En 2017, 1112 souches de cette catégorie ont été reçues de France métropolitaine (baisse de 13% par rapport à 2016 (n = 1278)) (Figure 15).

Figure 15. Nombre annuel de souches d'origine non humaine adressées au CNRL par des laboratoires français depuis 1996.



- Les laboratoires expéditeurs

La répartition des 1112 souches non humaines reçues au CNRL en 2017, par catégories de laboratoires expéditeurs, a changé avec une diminution du nombre de souches envoyée par les Laboratoire Vétérinaire Départementaux au profit des laboratoires privés devenus majoritaires, et est la suivante :

- | | |
|---|--------------------------------|
| • Laboratoires Vétérinaires Départementaux (LVD) : | 169 souches (15%) [2016 : 392] |
| • Laboratoires privés d'hygiène alimentaire : | 903 souches (81%) [2016 : 817] |
| • Laboratoires Interrégionaux de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes : | 25 souches (2%) [2016 : 16] |
| • Laboratoires ANSES – LNRI : | 8 souches (<1%) [2016 : 51] |
| • Laboratoires d'Hygiène de Centres Hospitaliers : | 7 souches (<1%) [2016 : 2] |
| • Laboratoires de recherche : | 0 souche (0%) [2016 : 0] |

- L'origine des souches

La répartition par origine des souches non humaines reçues en 2017 était la suivante :

• Souches isolées d'aliments :	891 souches (80%) [2016 : 1028]
• Souches isolées de l'environnement :	205 souches (18%) [2016 : 213]
• Souches de recherche/sans information :	14 souches (1%) [2016 : 37]
• Souches isolées chez l'animal :	2 souches (<0%) [2016 : 0]

Les proportions respectives des origines des souches non humaines sont globalement stables depuis 2006.

- Remarques

97% des souches reçues en 2017 appartenaient à l'espèce *Lm* (84% en 2016), qui est la seule espèce mentionnée dans les réglementations de sécurité sanitaire des aliments et de l'environnement. Certains laboratoires, à la demande de leurs clients, envoient pour confirmation des souches assignées à d'autres espèces de *Listeria* dans le cadre de la surveillance en *Listeria* spp. de l'environnement des ateliers de production (25). Une souche de *Listeria innocua* portant l'ilot de pathogénicité LIPI-1 a ainsi été transmis au CNRL pour analyse.

Le taux de réception de cultures non pures, contaminées par d'autres espèces bactériennes et rapidement détecté à l'isolement par l'identification Maldi-Tof MS, est élevé, autour de 22%, ce qui allonge le délai d'analyse et peut entraîner un retard dans les investigations épidémiologiques.

Souches isolées d'aliments

- Catégories de laboratoires ayant adressé les souches

La répartition des 889 souches isolées d'aliments reçues au CNRL de 2017 pour les différentes catégories de laboratoires expéditeurs était la suivante :

• Laboratoires Vétérinaires Départementaux (LVD) :	161 (18%) [2016 : 303]
• Laboratoires privés d'hygiène alimentaire :	690 (78%) [2016 : 662]
• Laboratoires Interrégionaux de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes :	25 (3%) [2016 : 16]
• Laboratoires ANSES-LNRI :	6 (<1%) [2016 : 46]
• Laboratoires d'hygiène de Centres Hospitaliers :	7 (<1%) [2016 : 1]

En 2017, le nombre de souches isolées d'aliments reçues au CNRL a diminué de 5% par rapport à 2016. Parmi elles, 2 souches provenaient d'un échantillon prélevé dans le cadre d'un plan de surveillance ou de contrôle sur le jambon confié par la DGAL au CNRL pour intégration dans la surveillance nationale et 6 souches envoyées dans le cadre d'investigation de clusters (toutes envoyées au CNRL par le LNRI).

- Nombre de souches et distribution par espèce

Sur un total de 889 souches d'origine alimentaire reçues au CNRL en 2017, 869 (98%) ont été identifiées comme appartenant à l'espèce *Lm* (98% en 2016). Toutes les souches reçues ont été analysées.

En 2017, 3 souches n'appartenaient pas au genre *Lm*; il s'agissait d'*Enterococcus faecalis* et d'*E. casseliflavus*, dont les colonies ont un aspect évocateur de *Listeria* spp. sur milieu Agar selon Ottaviani et Agosti (26).

Le CNRL avait détecté de nombreuses souches contaminées avec *E. faecalis* sur les milieux ALOA/ALOA-Like ce qui a été notifié aux fabricants. Cette bactérie est esculine positive, rhamnose positive et peut avoir une PIPLC comme *L. monocytogenes*.

La répartition par espèce des 889 souches de *Listeria* d'origine alimentaire reçues au CNRL en 2017 était la suivante:

• <i>L. monocytogenes</i> :	869 souches (98%) [2016 : 1007]
• <i>L. innocua</i> :	11 souches (1%) [2016 : 8]
• <i>L. innocua</i> + LIPI-1 :	1 souche (<1%) [2016 : 0]
• <i>L. welshimeri</i> :	2 souches (<1%) [2016 : 5]
• <i>L. seeligeri</i> :	1 souche (<1%) [2016 : 0]

- *L. ivanovii* subsp. *ivanovii* : 1 souche (<1%) [2016 : 0]
- *L. ivanovii* subsp. *londoniensis* : 1 souche (<1%) [2016 : 0]

L'identification des espèces est confirmée par l'analyse ANIb (Average Nucleotide Identification) des souches à partir des séquences génomiques.

✎ En 2017, la publication des deux normes analytiques NF EN ISO 11290 pour la recherche et le dénombrement des *Lm* et *Listeria* spp. devrait aboutir à l'augmentation du nombre d'identifications de souches non *Lm* en 2018.

- Distribution des souches de *L. monocytogenes* par catégorie d'aliments

La répartition par catégories d'aliments des 869 souches de *Lm* d'origine alimentaire reçues au CNRL en 2016 était la suivante :

- Viande et produits carnés : 324 souches (37%) [2016 : 507]
- Lait et produits laitiers : 342 souches (39%) [2016 : 257]
- Produits de la pêche : 133 souches (15%) [2016 : 151]
- Végétaux : 43 souches (5%) [2016 : 30]
- Autres aliments : 19 souches (2%) [2016 : 36]
- Sans information (confidentiel) : 8 souches (<1%) [2016 : 7]

La distribution est stable depuis 2011. Les « autres aliments » sont principalement des plats cuisinés et des pâtisseries. Les origines non précisées correspondent à des souches envoyées par des laboratoires privés qui n'ont pas souhaité transmettre cette information.

En 2013, une tolérance aux ammoniums quaternaires, comme le chlorure de benzalkonium, de souches alimentaires et environnementales (Complexes clonaux CC121, CC5 (et quelques souches du CC9)) a été décrite. Ce composé est très utilisé par les industries agroalimentaires pour le nettoyage des ateliers et équipements, ainsi que comme désinfectant en médecine et en cosmétologie. Une PCR ciblant un gène responsable de cette résistance a été mise au point (27). **Le CNRL identifie, par le biais du séquençage génomique, la présence des gènes connus pour être associés à la tolérance ou résistance aux antiseptiques.**

- Distribution des souches alimentaires de *Lm* par groupe PCR

La répartition des souches par groupes PCR et par catégories d'aliments est présentée dans le Tableau 5. Le groupe majoritaire est le groupe PCR IIa (sérovars 1/2a, 3a), quelle que soit la catégorie d'aliment, comme depuis 2006. Il est suivi par les groupes PCR IIc et IVb.

Comme l'illustrent la Figure 16 et le Tableau 5, le groupe PCR IVb (sérovars 4b, 4d et 4e) ne représente que 14% des souches alimentaires analysées en 2017 (18% des souches isolées d'aliments de 2011 à 2015), alors qu'il est le groupe le plus fréquemment impliqué en pathologie humaine. En revanche, le groupe IIc, très présent dans les aliments, est très rare en clinique. **Ceci suggère une virulence accrue des souches du groupe IVb par rapport aux autres (21, 22, 28-30), ce que nous avons démontré expérimentalement (21, 22, 28-30).** Les souches de ce groupe expriment une InIA fonctionnelle (facteur de virulence permettant la traversée des barrières intestinale et placentaire de l'hôte), tandis que celles du groupe IIc expriment en majorité une InIA tronquée et non fonctionnelle (21, 22, 30). Dans un modèle murin humanisé d'infection, les souches du groupe IVb apparaissent également plus virulentes (23).

Figure 16. Distribution par groupes PCR des souches de *Lm* cliniques et alimentaires en 2017 et entre 2006 et 2017

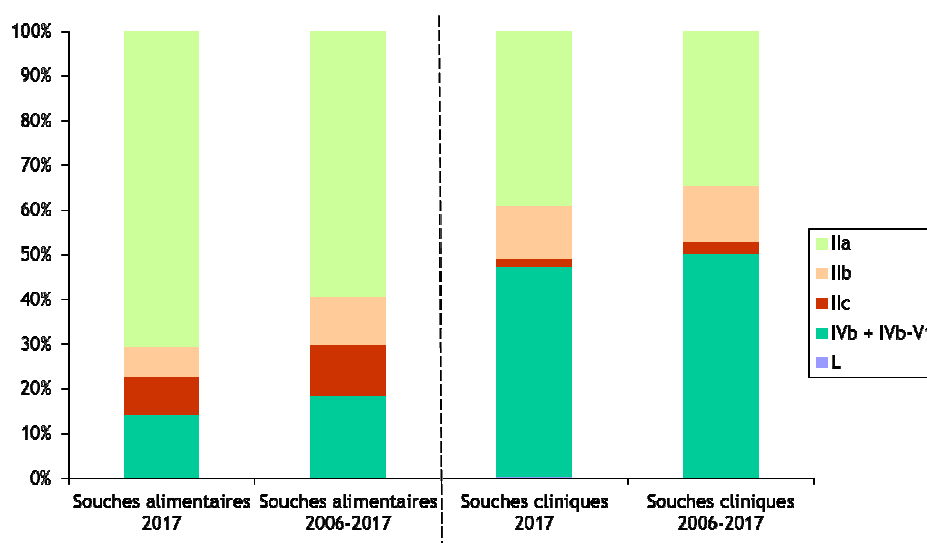


Tableau 5. Distribution par groupes PCR et par catégories d'aliments des souches alimentaires de *Lm* reçues au CNRL en 2017

Groupe PCR	viande et produits carnés	lait et produits laitiers	produits de la pêche	végétaux	autres aliments	origine non précisée	Total	Souches humaines
IIa	209	237	111	32	17	5	611 (70%)	138 (39%)
IIb	18	31	8	2	0	0	59 (7%)	42 (12%)
IIc	51	4	10	7	1	1	74 (9%)	6 (2%)
IVb	46	67	3	2	1	2	121 (14%)	166 (47%)
IVb-V1	0	0	0	0	0	0	0	1 (<1%)
L	0	3	1	0	0	0	4 (<1%)	0
Total	324	342	133	43	19	8	869	353

- Distribution des souches alimentaires de *Lm* par complexes clonaux

Une analyse similaire peut être pratiquée par typage MLST (Figure 14). Certains complexes clonaux, comme les CC121 et CC9, sont beaucoup plus fréquents parmi les souches alimentaires que cliniques ; ils ont été démontrés hypovirulents (23). À l'inverse, les clones CC1, 2, 4 et 6 sont beaucoup plus fréquemment identifiés en pathologie humaine que dans l'alimentation, et sont hypervirulents (23).

Souches isolées de l'environnement de production alimentaire industrielle

En 2017, 207 souches (2016 : 213 souches, soit -3%) provenant de l'environnement ont été reçues au CNRL, adressées par des laboratoires vétérinaires départementaux (n=8, 2015 : 89), des laboratoires privés (n=197, 2016 : 119) ou l'ANSES (LNR, LCSSV) (n=2, 2016 : 5). **Il s'agit principalement d'échantillons prélevés sur des surfaces dans des industries agroalimentaires ou isolées de réfrigérateurs dans le cadre d'enquêtes alimentaires** (article 5 du règlement européen EC 2073/2005 modifié sur les prélèvements de surface en agroalimentaire et avec le guide complémentaire à la norme EN ISO 18593 (en cours de révision) sur les prélèvements de surface pour *Lm* : Guidelines on sampling the food processing area and equipment for the detection of *Lm*: <https://sites.anses.fr/en/system/files/LRUE%20Lm-Lignes%20directrices%20pr%C3%A9%20C3%A8%20v3-20-08-2012.pdf>).

Ces souches étaient assignées à l'espèce *L. monocytogenes* (n = 196), *L. innocua* (n = 6), *L. welshimeri* (n = 2) and 3 souches non-*Listeria* (*Aerococcus viridans* (2) et *Enterococcus faecalis* (1)).

La répartition par groupe PCR des 196 souches de *Lm* environnementales isolées en 2017 est la suivante :

- groupe PCR IIa (sérovars 1/2a et 3a): 148 souches (76%) (2016 : 125)
- groupe PCR IIb (sérovars 1/2b, 3b et 7): 6 souches (3%) (2016 : 20)
- groupe PCR IIc (sérovars 1/2c et 3c): 5 souches (3%) (2016 : 28)
- groupe PCR IVb (sérovars 4b, 4d et 4e): 35 souches (18%) (2016 : 25)
- groupe PCR L (autres sérovars): 2 souches (<1%) (2016 : 0)

Les souches des groupes PCR IIa, IIc, et IVb sont majoritaires et représentent 96 % des souches.

En 2017, les CCs les plus fréquents dans l'environnement de production alimentaire étaient, par ordre décroissant, CC121, CC101-90, CC9, CC1 et CC31. De 2012 à 2017, CC121, CC5, CC9, CC8-16 et CC1 étaient les plus représentés. Les CCs hypovirulents et de virulence intermédiaire (23) sont donc prédominants dans cet environnement.

Ces données restent peu représentatives des souches qui circulent dans l'environnement à cause du faible échantillonnage de ces souches. L'isolement de souches à partir d'environnements naturels (tels que le sol, l'eau, la boue) serait important pour comprendre la circulation des souches entre cet environnement, les aliments et l'hôte humain, et pour déterminer la nature du réservoir de *Listeria*.

3.4. SURVEILLANCE DE LA RESISTANCE AUX ANTI-INFECTIEUX

Toutes les souches d'origine clinique identifiées présentent une résistance naturelle *in vitro* à la céfotaxime, à la clindamycine, à la fosfomycine, aux sulfonamides et à l'acide nalidixique.

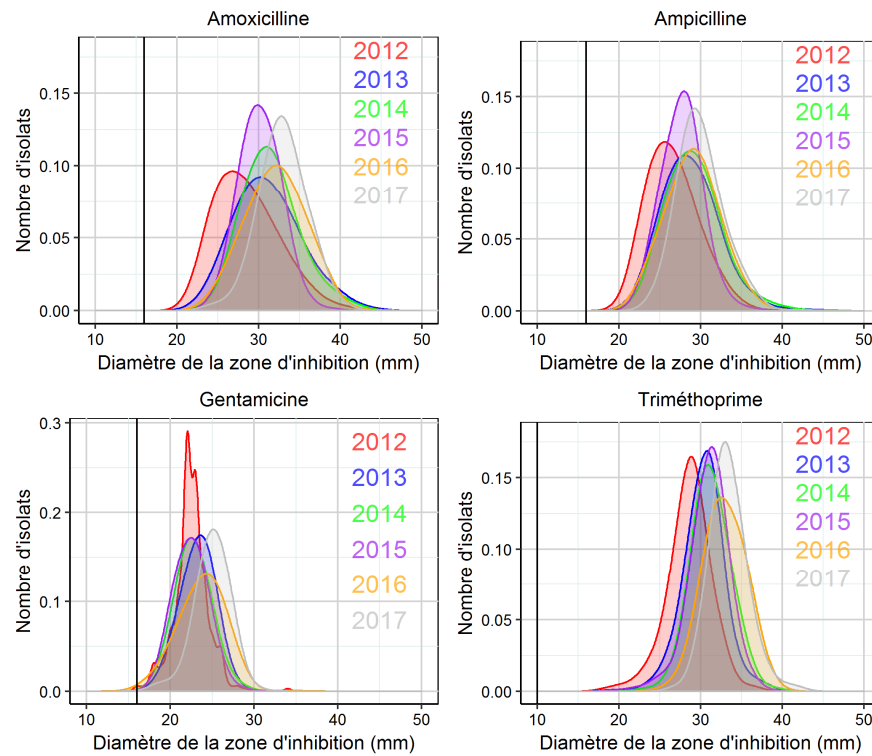
Depuis 2001, toutes les souches humaines identifiées sont sensibles à l'ampicilline, à l'amoxicilline, à la gentamicine (Figure 17), à l'imipénème, à l'acide fusidique, à la pénicilline et au chloramphénicol (31).

Les souches étaient très majoritairement sensibles à l'érythromycine, à la tétracycline, à la moxifloxacine, à la lévofloxacine, à la vancomycine, à la kanamycine et la streptomycine. Cependant, 4 souches résistantes à la tétracycline ont été identifiées en 2017 (résistance contact), avec détection moléculaire du gène *tetM*. Aucune association entre les complexes clonaux MLST et les résistances observées n'a été démontrée.

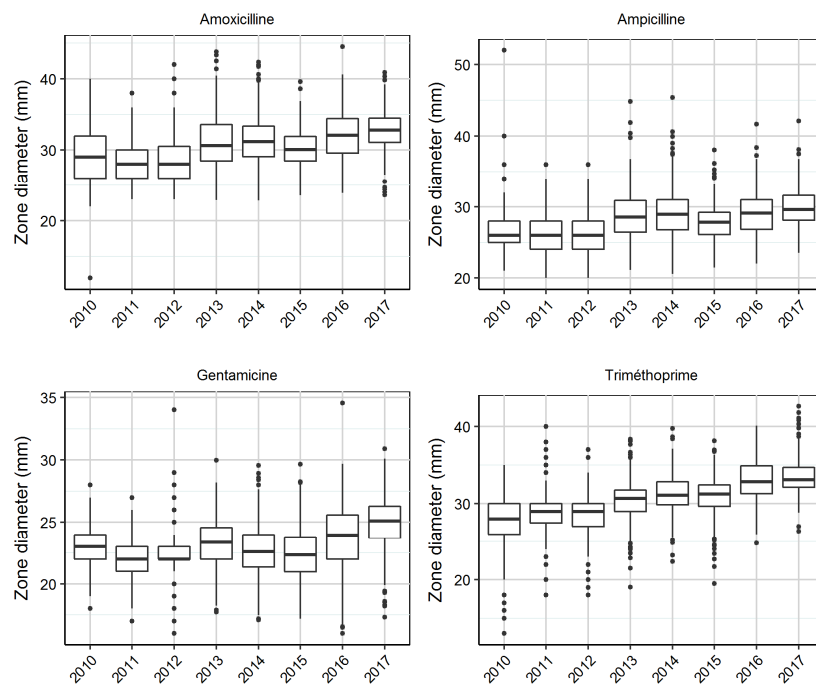
Bien que des souches d'origine non humaines résistantes à l'ampicilline ou à la gentamicine aient déjà été rapportées dans d'autres régions du monde (32, 33) aucune observation similaire n'a été faite en France pour des souches cliniques. Le suivi des tendances de la sensibilité de *Lm* aux antibiotiques de référence (Amoxicilline, Ampicilline, Gentamicine, Triméthoprim-Sulfaméthoxazole) montre la persistance d'une excellente sensibilité des souches à ces antibiotiques. Les conséquences cliniques de l'émergence d'une telle résistance seraient majeures, dans la mesure où l'amoxicilline est l'antibiotique utilisé en première intention pour le traitement de la listériose (34, 35).

Figure 17. Distribution des diamètres des zones d'inhibition pour l'ampicilline, l'amoxicilline, la gentamicine et le triméthoprime des souches reçues entre 2012 et 2017 (Légende : le trait noir indique la valeur de référence EUCAST définissant la résistance). A : Histogrammes ; B : Boîtes à moustaches.

A



B



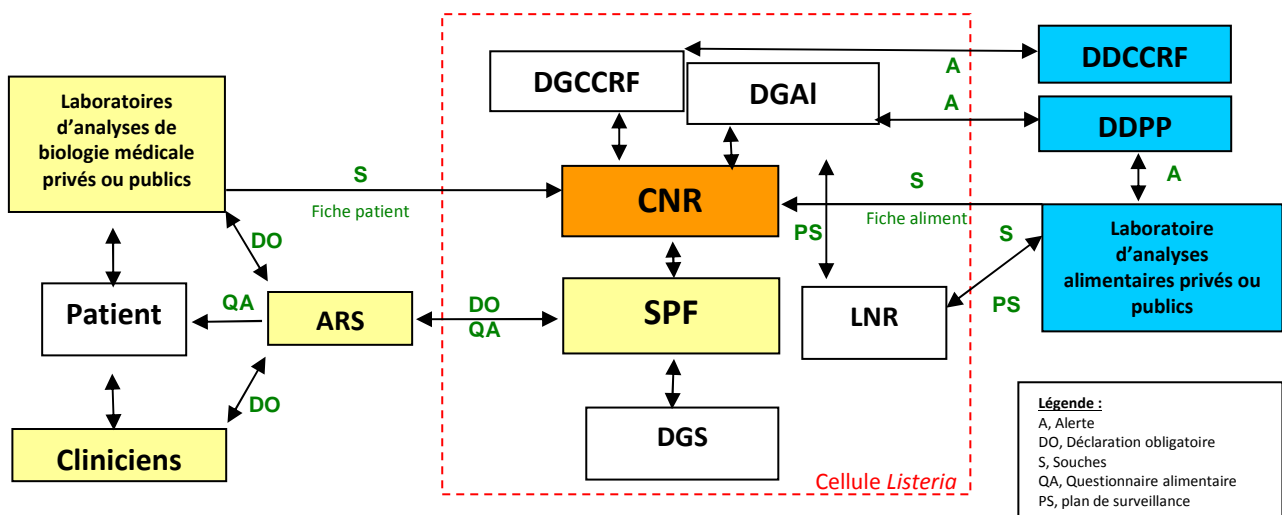
3.5. INTERFACE AVEC LES RESEAUX DE SURVEILLANCE NATIONAUX OU INTERNATIONAUX

3.5.1. Contribution à la surveillance nationale

Le CNRL détecte les cas groupés et participe aux investigations destinées à identifier l'origine alimentaire des cas (36). Cette surveillance s'effectue en lien avec SPF, la Direction Générale de l'Alimentation (DGAI) et la Direction Générale de la Consommation, de la Concurrence et de la Répression des Fraudes (DGCCRF), qui constituent la Cellule interministérielle *Listeria*, comprenant également la DGS et l'ANSES (Figure 18). Le fonctionnement de cette entité est formalisé depuis janvier 2004 par la « Procédure relative au fonctionnement de la Cellule *Listeria* chargée de la coordination des investigations et des actions autour de cas groupés de listériose ». Les missions de la cellule sont (i) la détection des cas groupés de listériose, (ii) la proposition et la coordination des investigations et actions à mettre en œuvre devant des cas groupés potentiellement liés à une source commune de contamination, (iii) leur gestion et leur prévention.

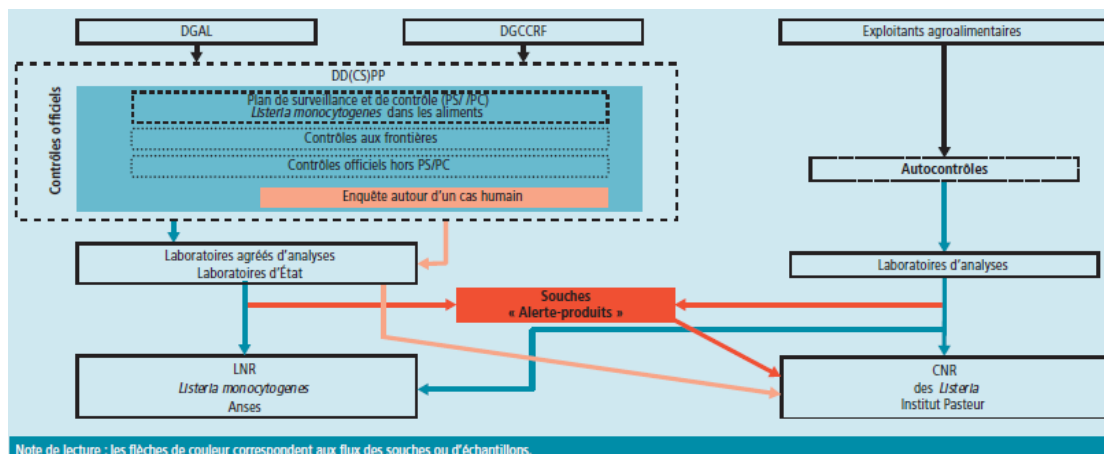
Le rôle du CNRL dans la surveillance est présenté dans la Figure 19.

Figure 18. Schéma de fonctionnement de la cellule *Listeria*



CNR : Centre national de Référence des *Listeria* ; LNR : Laboratoire National de référence ; SPF : Santé Publique France ; DGAI : Direction Générale de l'Alimentation ; DDPP : Directions Départementales de la Protection des Populations ; DDCCRF : Direction Départementales de la Consommation et de la Répression des Fraudes ; DGCCRF : Direction Générale de la Consommation et de la Répression des Fraudes ; ARS : Agence Régionale de Santé ; DGS : Direction Générale de la Santé.

Figure 19. Circuit des souches sur le schéma de surveillance microbiologique français des *Listeria monocytogenes*, tel que formalisé par la Cellule *Listeria* (Source : BEH. 2012. Surveillance des *L. monocytogenes* dans les aliments. Hors-Série : 41-45 (37))



SURVEILLANCE MICROBIOLOGIQUE DE LA LISTERIOSE EN FRANCE

Le diagnostic de listériose repose sur l'isolement de *Lm* à partir d'un prélèvement biologique physiologiquement stérile ou de prélèvements périnataux. Les cas diagnostiqués par une autre technique (biologie moléculaire ou sérologie) ne sont à ce jour pas retenus dans le cadre de la DO (38).

L'activité de surveillance du CNRL consiste à :

1. Confirmer l'identification de la souche ;
2. Analyser les caractéristiques microbiologiques (groupe PCR, MultiLocus Sequence Typing (MLST), core genome MLST (cgMLST), sensibilité aux antibiotiques) des souches isolées de cas humains, d'aliments ou d'environnement agroalimentaires ;
3. Recueillir les informations cliniques associées aux cas ou aux souches d'aliments ou d'environnement agroalimentaires au moyen d'une fiche de renseignements.

Ces éléments permettent :

1. d'identifier les souches doublons (patients transférés dans différents hôpitaux, couples mère-enfant comptant pour une seule infection, etc.)
2. de suivre les tendances épidémiologiques (répartition des formes cliniques, caractéristiques des souches, évolution du nombre de cas, etc.) ;
3. de détecter les épidémies, par la détection de cas groupés, en caractérisant les souches isolées et en surveillant l'apparition de cas qui lui sont liés ;
4. de participer à l'étude des phénomènes épidémiques en lien avec SPF : identification des cas épidémiques, du véhicule alimentaire, caractérisation de la souche épidémique.

SURVEILLANCE ET CLUSTERS

On distingue plusieurs étapes successives d'alerte, redéfinies le 10 Janvier 2017 par la cellule interministérielle *Listeria*, sur la base de l'analyse génomique cgMLST qui remplace la macrorestriction d'ADN (PFGE):

1. Définition de cluster dans le cadre de l'analyse génomique

Un **cluster** de souches est défini depuis 2015 par la mise en évidence d'au moins deux souches dont au moins une souche humaine, ayant une similarité de plus de 99,60% (7 allèles différentes sur 1748 loci détectés du core génome du cgMLST).

2. Surveillance microbiologique hebdomadaire

Le CNRL effectue depuis Janvier 2017 chaque semaine un tableau de suivi des clusters (optimisé en réunion DGAI/CNRL/SPF en Janvier 2017) qui est envoyé par courrier électronique à SPF, la DGAI et la DGCCRF, regroupant dans le détail sur les souches alimentaires/environnementales d'alertes produits, le détail anonyme sur les souches humaines des clusters et les souches d'autocontrôles des clusters simplement mentionnés par le numéro de CLIP CNRL.

3. Surveillance renforcée

Décidé par SPF, tout cluster de plus de 2 cas est normalement suivi d'une phase de surveillance renforcée durant laquelle le CNRL signale toute nouvelle souche d'origine humaine ou alimentaire similaire à ce cluster, tandis que SPF conduit les questionnaires alimentaires et les enquêtes épidémiologiques appropriées. La Cellule *Listeria* décide au vu des résultats de ces investigations des actions à mettre en œuvre : analyse des informations disponibles (résultats des contrôles, retraits de produits), demande de transmission au CNRL de souches isolées à la production ou à la distribution, identification des marques commercialisant les produits contaminés, prélèvements dans les magasins où s'approvisionnent les patients, enquêtes dans des établissements de production, etc. La phase de surveillance renforcée est close par décision entre le CNRL, SPF et la DGAI ou la DGCCRF.

4. Phase d'Alerte

La Cellule *Listeria* peut décider du passage en phase d'alerte, définie comme toute situation présentant une menace potentielle pour la santé publique et nécessitant la mise en œuvre d'investigations ou d'actions complémentaires, soit en raison du nombre de cas détectés, soit en raison des hypothèses sur l'origine de la contamination.

La Cellule *Listeria* propose les investigations complémentaires et les actions à mener. Toutes les souches de *Lm* isolées dans le cadre de ces investigations sont envoyées au CNRL. La phase d'Alerte est levée par la Cellule *Listeria*. Certaines mesures spécifiques de surveillance peuvent être maintenues après la levée de l'Alerte.

5. Cas sporadiques, groupés et épidémies

Des cas liés à des souches de même cgMLST, mais dont la source n'a pas été identifiée sont qualifiés de groupés. Une « épidémie » correspond à des cas groupés dont la source alimentaire a été identifiée. Un cas isolé dont la source n'a pas été identifiée est qualifié de sporadique. L'accroissement du nombre de génomes dans base de données cgMLST du CNRL et l'abandon d'une fenêtre temporelle pour la comparaison des souches tend à diminuer le nombre de cas sporadiques, et à créer de clusters de grande taille. Ceci a pour conséquence la détection de sites de production alimentaire distillant sur de longues durées des souches de *Lm* d'un même cgMLST, dont l'éradication pourrait avoir un impact sur la contamination alimentaire et le nombre de cas de listérioses.

6. Toxi-infection alimentaire collective

Il s'agit de la survenue d'au moins deux cas de gastro-entérite à *Lm* dont on peut rapporter la cause à une même origine alimentaire.

3.5.2. Contribution à la surveillance alimentaire

Les alertes-produits

Une alerte produit est déclenchée quand une denrée alimentaire non-conforme aux critères microbiologiques de sécurité du règlement européen 2073/2005 modifié (100 UFC/g ou absence/présence) (25, 39), et présentant donc un risque pour la santé publique, a été mise sur le marché et que des mesures de retrait et/ou rappel auprès du consommateur doivent être prises. Les alertes-produits peuvent être issues de contextes de surveillance variés comme les contrôles officiels, les autocontrôles effectués par les professionnels ou les plans de surveillance et de contrôle.

En France, ces alertes-produits sont déclenchées en cas de présence de *Lm* au sein de tout produit mis sur le marché, à consommer en l'état et permettant la croissance de *Listeria*, quel que soit le résultat du dénombrement, limite plus stricte que celle prévue par le règlement européen 2073/2005 modifié (100 UFC/g) (25, 39). Le CNRL effectue chaque semaine un tableau par courrier électronique aux membres de la Cellule *Listeria*, concernant les souches d'alertes-produits et leurs caractéristiques transmis. SPF investigate uniquement les clusters cgMLST où au moins une souche d'alerte produit était reliée. Les clusters 1 souche humaine/1 souche alimentaire ou environnementale étant très présents, de nombreuses investigations ont été demandées aux DDPP ce qui a changé les demandes habituelles sur des larges cas groupés.

Les enquêtes autour d'un cas de forme neuroméningée

Depuis 2001, pour tous les cas d'infection neuroméningée (cas avec signes cliniques d'atteinte neuroméningée et souche de *Lm* isolée du sang ou du LCR), des prélèvements des aliments dans le réfrigérateur du patient ou de son environnement (avec l'accord du patient ou le cas échéant de sa famille) sont réalisés par la DDPP. Des prélèvements dans les lieux d'achats du patient par la DDPP ou la DDCCRF peuvent également être effectués. Le CNRL compare le Type cgMLST des souches isolées des aliments à celle(s) isolée(s) chez le patient afin de tenter d'identifier l'aliment à l'origine du cas.

3.5.3. Alerte sur les résistances atypiques aux traitements de référence

La surveillance de la résistance de *Lm* aux antibiotiques est effectuée pour 23 antibiotiques (céfotaxime, sulfonamides, kanamycine, clindamycine, rifampicine, tétracycline, érythromycine, chloramphénicol, ciprofloxacine, moxifloxacine, lévofloxacine, triméthoprim, gentamicine, acide fusidique, vancomycine, streptomycine, pénicilline G, ampicilline, amoxicilline, acide nalidixique, imipénème, fosfomycine), à la recherche de résistances naturelles ou acquises, selon la méthodologie EUCAST de diffusion. Les résultats de la surveillance des souches d'origine humaine isolées de 2017 ont été présentés dans le chapitre 3.4.

3.5.4. Alerte Infections nosocomiales

Le caractère nosocomial des infections à *Lm* est difficile à établir, car l'incubation de la listériose peut être longue (40) et la source alimentaire de l'infection est difficile à identifier.

Ce mode de contamination a été décrit :

- soit par des aliments consommés à l'hôpital,
- soit par transmission croisée, notamment par le biais de matériel contaminé par un enfant infecté (thermomètres, couveuses, huile de soins).

Le pouvoir de discrimination du cgMLST permet la détection de souches d'infections nosocomiales transmises jusqu'en 2015 en cas de persistance dans des cuisines hospitalières. Cette identification de ces clusters spécifiques déclenche une notification à SPF et une enquête impliquant SPF, l'ARS, la DGAI/DDPP et le CNRL ainsi que le CLIN et l'hygiéniste hospitalier concerné est conduite pour identifier l'origine de l'infection.

Les bactériémies ou infections neuroméningées contractées chez des patients hospitalisés depuis plus de 15 jours et sans apport de nourriture extérieur entraînent une inspection de la cuisine hospitalière, et la réalisation de prélèvements alimentaires et de surface.

3.5.5. Interface avec les acteurs nationaux

SPF : Le CNRL est en lien quotidien avec SPF pour la surveillance nationale et le suivi de dossiers de souches humaines ou d'investigations, et pour la gestion de phénomènes anormaux.

DGS – DGAI – DGCCRF : Le CNRL est en lien pluri-hebdomadaire avec la DGAI dans le cadre du suivi des alertes-produits et des enquêtes sur les formes neuroméningées ou une demande d'appui technique. Le CNRL participe à des réunions coordonnées par la DGS dans le cadre de gestion d'alertes, de cas groupés ou d'épidémies. Le CNRL, au sein de la cellule *Listeria*, est en lien direct et simultané avec la DGS, DGAI et la DGCCRF.

En 2017, le CNRL a participé, grâce à 2 étudiants du Master ALISÉE d'AgroParisTech sous la direction de Corinne Danan (DGAJ, Adjointe au chef du Bureau d'appui à la surveillance de la chaîne alimentaire, Responsable du pôle "Surveillance") à la mise à jour des données et fiche sur « La listériose » du portail "zoonose" du Ministère de l'agriculture et de l'alimentation (<http://agriculture.gouv.fr/la-listeriose>). Il a participé avec le CORRUS/DGS à une formation sur un nouveau logiciel de la DGAI sur la traçabilité utilisable en cas de crises ou d'investigations de clusters de cas humains/épidémies.

ANSES et LNRI: Cette interaction est décrite dans le chapitre 7 de ce rapport. Le CNRL participe à l'examen de saisines DGS/DGCCRF/DGAJ en tant qu'expert pour le CES « BioRisk » de l'ANSES.

Le CNRL a commenté avec l'ANSES le document Scientific Opinion on *Listeria monocytogenes* contamination of ready-to-eat foods and the risk for human health in the EU de l'EFSA.

SURVEILLANCE MICROBIOLOGIQUE DE LA LISTERIOSE EN EUROPE

ECDC

L'ECDC a mis en place un système volontaire d'investigations de cas groupés ou d'épidémies européens au moyen de la plateforme d'échanges EPIS (Epidemic Intelligence Information System), ouverte aux pays européens, aux USA,

au Canada, à l'Australie, la Nouvelle-Zélande, l'Afrique du Sud, la Turquie, l'Islande, la Norvège et le Japon. Ce système permet un échange de données de typages et d'informations concernant les cas groupés et les épidémies.

La base européenne ECDC TESSY (European Surveillance System) regroupe les données épidémiologiques transférées de façon volontaire et non exhaustive par les agences de santé publique nationales. Cette base est complétée par TESSY MOL, dont l'objectif est de lier les données épidémiologiques des cas humains aux données microbiologiques correspondantes (génotypage et typage moléculaire PFGE ou cgMLST) pour rendre possible une surveillance microbiologique européenne et une détection précoce des cas groupés ou épidémies au sein des pays participants, en lien avec la plateforme EPIS.

Il contribue, par le biais de SPF, à la notification de données françaises dans la base ECDC TESSY (European Surveillance System), et participe ainsi à la surveillance des maladies infectieuses au niveau européen. Le CNRL participe également, en relation avec SPF, aux investigations de cas groupés ou épidémies européennes, nommées « Urgent Inquiries », et signalées via la base ECDC EPIS (Epidemic Intelligence Information System). Il assure la compatibilité de la base du CNRL avec la base Européenne TESSY Mol, connectées depuis décembre 2012.

Le CNRL a participé en 2017 :

- au groupe de travail *Listeria* du réseau européen des maladies d'origine hydrique et alimentaire (FWD) (A. Leclercq) ;
- au meeting annuel du FWD network (18 Octobre 2017, Parma, A. Moura) ;
- à l'ECDC-EFSA networks' meeting (Parma, 16-17 Octobre, A. Moura) ;
- à l'exercice européen EFSA-ECDC, au projet ELITE (European *Listeria* Typing Exercise) et à la Base Line Study EFSA (étude sur la contamination des aliments prêts-à-consommer et les cas humains survenus sur la période 2010-début 2011) avec à un article décrit au chapitre 6: *Van Walle I, Torgny Björkman J, Cormican M, Dallman T, Mossong J, Moura A, Pietzka A, Ruppitsch W, European Listeria WGS typing group (dont Lecuit M, Leclercq A), Takkinen J. 2018. Retrospective validation of whole genome sequencing-enhanced surveillance of listeriosis in Europe. Accepté dans Eurosurveillance, et un ECDC technical document: European Listeria Typing Exercise, Extension to Whole Genome Sequencing (Elite WGS);*
- à la révision de l'Atlas de surveillance Food and Waterborne diseases (données 2016) ;
- à des rapports conjoints annuels EFSA-ECDC sur les zoonoses (European Union Summary Report (EUSR) on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in EU, in 2016),
- à une enquête sur « changes and practices in the national surveillance systems for invasive listeriosis » et “national capacity for Whole Genome Sequencing (WGS) use for Public Health applications in EU/EEA countries” ayant abouti à l'article *Revez J, Espinosa L, Albiger B, Leitmeyer KC, Struelens MJ and ECDC National Microbiology Focal Points and Experts Group. 2017. Survey on the Use of Whole-Genome Sequencing for Infectious Diseases Surveillance: Rapid Expansion of European National Capacities, 2015–2016. Front. Public Health 5:347.*

EFSA

Le CNRL participe ou a participé:

- en lien avec le Statens Serum Institute de Copenhague, au projet EFSA WGS intitulé « Closing gaps for performing a risk assessment on *L. monocytogenes* in ready-to-eat. Activity 3 – Comparison food and human isolates”;
- au Stakeholder meeting à l'EFSA (Parma, Italie, A. Leclercq) le 19-20 septembre 2017 on draft scientific opinion on “*Listeria monocytogenes* contamination of ready-to-eat foods and the risk for human health in the EU” sur les points suivants: the potential health effects associated with *L. monocytogenes* and the relation between doses and illness in different risk groups; the exposure to *L. monocytogenes* by consumption of RTE foods, and the trends of human listeriosis cases in the EU with potential explanatory factors;
- à la Scientific opinion EFSA par ses données et ses analyses: EFSA BIOHAZ Panel (EFSA Panel on Biological Hazards), Ricci A, Allende A, Bolton D, Chemaly M, Davies R, Fernández Escámez PS, Girones R, Herman L, Koutsoumanis K, Nørrung B, Robertson L, Ru G, Sanaa M, Simmons M, Skandamis P, Snary E, Speybroeck N, Ter Kuile B, Threlfall J, Wahlström H, Takkinen J, Wagner M, Arcella D, Da Silva Felicio MT, Georgiadis M, Messens W and Lindqvist R, 2018. Scientific Opinion on the *Listeria monocytogenes* contamination of ready-to-eat foods and the risk for human health in the EU. EFSA Journal 2018;16(1):5134, 173 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5134>

DG SANTE (RASFF)

Le réseau RASFF de l'Union européenne est un outil d'échange d'informations sur les mesures prises pour garantir la sécurité alimentaire : les notifications d'alertes (produits alimentaires à risque sur le marché nécessitant une action immédiate) et notifications informatives (mise en place d'une alerte nationale ayant entraîné des mesures telles que le retrait ou le refus de produits alimentaires) sont transmises aux membres du réseau (DGAI, DGCCRF, SPF), qui les communiquent au CNRL.

Ce système est complété au niveau mondial par le réseau INFOSAN de l'OMS. Le CNRL/CCOMS est contacté pour expertiser certaines alertes (Chapitre 4.5.).

CEN (Comité Européen de Normalisation)

En 2017, le CNRL a participé en normalisation de la Microbiologie de la chaîne alimentaire concernant *Listeria* :

- aux réunions Afnor V08B, CEN TC275/WG6 et ISO TC34/SC9 sur les méthodes EN ISO 11290 de détection et d'énumération des *Lm* dans la chaîne alimentaire publiées en Juin 2017. A. Leclercq a été coordinateur scientifique de ce programme de validation de méthodes (mandat M381 de la Commission Européenne : DG Santé et DG Grow).
- au développement de la norme NF EN ISO 16140-6 sur la validation des méthodes microbiologiques de confirmation (identification, typage moléculaire).
- à l'ISO TC34/SC9/WG25 sur la normalisation du Whole Genome sequencing et typages associés.

EURL *Lm*

Le laboratoire de référence des *Listeria* de l'Union Européenne (EURL) est situé au laboratoire ANSES-LSA de Maisons-Alfort, également LNRL. Ses missions consistent à l'analyse de l'antibiorésistance des souches zoonotiques et la mise au point de méthodes d'essais dans le domaine alimentaire et vétérinaire pour la détection, l'énumération et la caractérisation des *Lm*.

En 2017, l'EURL *Lm* a sollicité le CNRL dans le cadre de l'Urgent Inquiry UI-444 Finlandaise, pour répéter les analyses faites par le CNRL et préalablement communiquées à l'ECDC/EFSA/DG SANTE.

La DG SANTE a sollicité le CNRL/CCOMS afin d'évaluer la fréquence d'isolement, en Europe et en France, de souches de *Lm* non hémolytiques dans des échantillons alimentaires et vétérinaires. L'EURL *Lm*/LNRL a ensuite envoyé une demande officielle aux CCOMS/CNRL des *Listeria* pour définir l'impact de ces souches atypiques sur la santé publique. Le CNRL a publié la réponse à cette demande sur (i) la prévalence de ces souches dans les échantillons cliniques, alimentaires et environnementaux, (ii) les origines moléculaires de ce caractère non hémolytique, et (iii) l'impact sur la virulence des souches (4).

SURVEILLANCE MICROBIOLOGIQUE INTERNATIONALE DE LA LISTERIOSE

OMS

L'Unité de Biologie des Infections héberge le Centre Collaborateur de l'OMS des *Listeria* (Site web : <http://www.pasteur.fr/fr/sante/centres-collaborateurs-l-oms-ccoms/listeriose-d-origine-alimentaire>).

Dans ce cadre, l'équipe du CNRL participe à la surveillance internationale de la listériose, à la collecte de données pour l'analyse des risques réalisée par l'OMS, à la surveillance de la résistance aux agents antimicrobiens des *Listeria*, et à la formation des personnels qui le contactent (41, 42). Le CCOMS a ainsi formé des stagiaires désireux de s'initier aux techniques de surveillance et de typage de *Lm*. En 2017, une stagiaire du Costa Rica a été formée au CCOMS/CNRL pour apprendre ce qu'est un système de surveillance nationale des *Listeria* et des méthodes employées. Le CNRL répond aux sollicitations de l'OMS et apporte une assistance technique en cas de crise sanitaire. Ceci a été le cas lors de l'épidémie de listériose en Afrique du Sud fin 2017. Le CCOMS a analysé par cgMLST les séquences de souches transmises par le National Institute for Communicable Diseases (NICD). Le large panel de souches qui lui sont envoyées par ses différents correspondants internationaux lui permet de conduire des études sur la biodiversité de *Listeria* à grande échelle.

Office International des Epizooties (OIE)

Le CNRL à travers le CCOMS répond aux sollicitations de l'OIE sur des questions concernant *Listeria*.

PulseNet International

Sylvain Brisse (C3BI : Centre de Bioinformatique, Biostatistique et Biologie Intégrative, Institut Pasteur) a représenté le CNR/CCOMS *Listeria* au PulseNet International meeting on global foodborne disease surveillance: Towards publicly available databases and tools, Winnipeg, Canada, 21-22 Juin 2017, sur la mise en place du WGS et des bases de données dans le réseau Pulsenet international.

Center for Disease Control

Le CNRL a participé à la réunion du 15 septembre 2017 à SPF entre SPF et le CDC Atlanta sur les infections d'origine alimentaire en présence de Robert Tauxe, qui a abordé les points suivants : le WGS en surveillance de routine, les dernières investigations d'épidémies, l'utilisation de méthodes diagnostic sans culture : PCR syndromiques, un résumé des différentes activités de surveillance des infections d'origine alimentaire dont *Listeria*.

3.6. ENQUETE OU ETUDES PONCTUELLES CONCOURANT A LA SURVEILLANCE

Etude MONALISA: Multicentric Observational National Analysis of LIsteriosis and Listeria

Présentation Orale :

C. Charlier, E. Perrodeau, A. Leclercq, V. Goulet, P. Ravaud, M. Lecuit. Clinical features and prognostic factors of listeriosis: the MONALISA study. ISOPOL, Paris, 2016.

Charlier C. Actualités sur la Listériose. 37^{ème} Réunion Interdisciplinaire de chimiothérapie anti-infectieuse, Paris, Décembre 2017.

Article :

Charlier C, Perrodeau E, Leclercq A, Cazenave B, Pilmis B, Henry B, Lopes A, Maury MM, Moura A, Goffinet F, Dieye H, Thouvenot P, Ungeheuer MN, Tourdjman M, Goulet V, de Valk H, Lortholary O, Ravaud P, Lecuit M, group Ms. 2017. Clinical features and prognostic factors of listeriosis: the MONALISA national prospective cohort study. Lancet Infect Dis 17:510-519.

Abstract:

BACKGROUND: Listeriosis is a severe foodborne infection and a notifiable disease in France. We did a nationwide prospective study to characterise its clinical features and prognostic factors.

METHODS: MONALISA was a national prospective observational cohort study. We enrolled eligible cases declared to the National Reference Center for *Listeria* (all microbiologically proven) between Nov 3, 2009, and July 31, 2013, in the context of mandatory reporting. The outcomes were analysis of clinical features, characterisation of *Listeria* isolates, and determination of predictors of 3-month mortality or persisting impairment using logistic regression. A hierarchical clustering on principal components was also done for neurological and bacteraemic cases. The study is registered at ClinicalTrials.gov, number NCT01520597.

FINDINGS: We enrolled 818 cases from 372 centres, including 107 maternal-neonatal infections, 427 cases of bacteraemia, and 252 cases of neurolisteriosis. Only five (5%) of 107 pregnant women had an uneventful outcome. 26 (24%) of 107 mothers experienced fetal loss, but never after 29 weeks of gestation or beyond 2 days of admission to hospital. Neurolisteriosis presented as meningoencephalitis in 212 (84%) of 252 patients; brainstem involvement was only reported in 42 (17%) of 252 patients. 3-month mortality was higher for bacteraemia than neurolisteriosis (hazard ratio [HR] 0.54 [95% CI 0.41-0.69], $p<0.0001$). For both bacteraemia and neurolisteriosis, the strongest mortality predictors were ongoing cancer (odds ratio [OR] 5.19 [95% CI 3.01-8.95], $p<0.0001$), multi-organ failure (OR 7.98 [4.32-14.72], $p<0.0001$), aggravation of any pre-existing organ dysfunction (OR 4.35 [2.79-6.81], $p<0.0001$), and monocytopenia (OR 3.70 [1.82-7.49], $p=0.0003$). Neurolisteriosis mortality was higher in blood-culture positive patients (OR 3.67 [1.60-8.40], $p=0.002$) or those receiving adjunctive dexamethasone (OR 4.58 [1.50-13.98], $p=0.008$).

INTERPRETATION: The severity of listeriosis is higher than reported elsewhere. We found evidence of a significantly reduced survival in patients with neurolisteriosis treated with adjunctive dexamethasone, and also determined the time window for fetal losses. MONALISA provides important new data to improve management and predict outcome in listeriosis.

FUNDING: Programme Hospitalier Recherche Clinique, Institut Pasteur, Inserm, French Public Health Agency.

A la suite de cette étude, nous étudions plusieurs aspects spécifiques de cette cohorte :

- **Etude MONALISA-RADIO.** Analyse des imageries cérébrales de 71 patients avec neurolistériose. Cette étude a permis de caractériser la présentation radiologique et d'identifier de nouveaux facteurs pronostiques radiologiques. Ce travail constitue un des volets du projet Sinergia (financé par le fonds national suisse pour la recherche scientifique) visant à comparer dans une optique One Health les neurolistérioses du bétail et de l'homme (caractérisation génotypique des souches, modèles animaux, confrontation radiologique) en collaboration avec Anna Oervermann et Joachim Frey (Université de Berne).

Imaging of human neurolisteriosis: a prospective study of 71 cases

Article sous Presse Clinical Infectious Diseases: Charlier C, Poirée S, Delavaud C, Khoury G, Richaud C, Leclercq A, Hélénou O, Lecuit M. Imaging of human neurolisteriosis: a prospective study of 71 cases.

ABSTRACT:

Background

Neurolisteriosis ranks among the most severe neurological infections. Its radiological features have not been thoroughly studied. We aimed to describe the neuroradiological features of neurolisteriosis and assess their prognostic value.

Methods

Patients with microbiologically-proven neurolisteriosis were enrolled from November 2009 to October 2013 in the nationwide MONALISA study. Magnetic resonance and computed tomography images were studied by two independent neuroradiologists. Predictors of 3-month mortality were determined using logistic regression.

Results

Seventy-one patients were included; 42 were men (59%). Mean age was 64 years. Sixty patients (85%) reported signs of encephalitis, with clinical brainstem involvement in 16 (23%). Images were abnormal in 87% of cases (62/71). Main neuroradiological images were meningeal enhancement (25/71, 35%), abscess(es) or nodular image(s) evocative of abscess (10/71, 14%), haemorrhages (11/71, 15%), contrast-enhancing ventricles or hydrocephalus (7/71, 10%). White-matter images (42/71, 59%), dilated Virchow-Robin spaces (22/71, 31%) and cerebral atrophy were also reported (34/71, 48%). Brainstem involvement (meningeal enhancement, abscess) was reported in only 7/71 cases (10%). Three-month survival was lower in patients with hydrocephalus or contrast-enhancing ventricles (1/7 (14%) than without (47/64, 73%), $p=0.005$) and in patients with parenchymal images (abscess(es), nodule(s) or white matter images) (25/46 (54%) versus 23/25 without (92%), $p=0.004$). Parenchymal images were associated with lower 3-month survival in the multivariable model (odds ratio 5.60, 95% CI [1.42-29.6], $p=0.02$).

Conclusions

Neurolisteriosis presents as a combination of neuroradiological images, none being specific. Radiological signs of rhombencephalitis are uncommon, whereas, unexpectedly, hemorrhagic images are frequent. The negative prognostic value of parenchymal neuroradiological images was evidenced.

- **MONALISA-BABY.** L'analyse du devenir à 6 ans des enfants avec listériose périnatale a débuté en 2015 (CRC AP-HP 80k€), et permettra d'établir s'il existe chez ces enfants des séquelles à long terme, et le rôle respectif de la prématurité, du sepsis et de l'infection du système nerveux central dans ces séquelles éventuelles (collaboration avec PY Ancel, responsable de la cohorte EPIPAGE2).

- **MONALISAGENBIO :** Etude de la susceptibilité génétique de l'hôte vis-à-vis de *Listeria monocytogenes* (génotypage SNPs des 1100 patients et témoins de l'étude, séquençage d'exome des patients présentant des formes particulièrement sévères ou survenant en l'absence de toute susceptibilité identifiée). En collaboration avec l'équipe de génétique humaine évolutive (Lluís Quintana, Institut Pasteur) et celle de Dusan Bogunovic (Mount Sinai Hospital, NYC, USA). (ANR/PRTS 850k€).

4. ENQUETES OU ETUDES PONCTUELLES CONCOURANT A LA SURVEILLANCE ET ALERTE

L'ensemble du système de surveillance et d'alerte français a été décrit dans le chapitre 3.5.

4.1. SUSPICIONS D'INFECTIONS NOSOCOMIALES

À 20 reprises en 2017 (16 en 2016), le diagnostic de plusieurs cas de listériose groupés temporellement et géographiquement (même hôpital, voire même service) a fait suspecter une infection nosocomiale (43, 44). En 2017, 4 bactériémies contractées chez des patients hospitalisés depuis plus de 15 jours ont été investiguées (3 en 2016). Dans un seul cas, les deux souches réceptionnées appartenaient au même cluster 154 du cgMLST Type CT1718.

Le CNRL reçoit fréquemment des demandes d'hygiénistes d'établissements de soins (notamment EHPAD) pour obtenir des recommandations concernant la maîtrise de la contamination des aliments par *Lm*.

La méthode cgMLST par sa grande discrimination permet de détecter rapidement des cas groupés.

Une difficulté de suivi des infections nosocomiales est la création de plateforme de biologie médicale dans les centres hospitaliers effectuant des sous-traitements et remplissant, pour les LABM clients d'origine, les fiches de renseignements du CNR sans connaître l'ensemble des données.

4.2. CLUSTERS cgMLST

Depuis Janvier 2015, le CNRL utilise le séquençage du génome complet des souches (WGS) et la méthode de typage core génome MLST (cgMLST) (9, 10). Les informations sur l'investigation des clusters cgMLST sont détenues par Santé Publique France et la DGAL.

Le haut pouvoir de discrimination du cgMLST permet de s'affranchir des fenêtres temporelles et spatiales lors de l'investigation des cas groupés. Le cgMLST permet ainsi de détecter des cas liés qui sont géographiquement et temporellement séparés.

Ces caractéristiques sont intéressantes compte-tenu :

- de la distribution rapide des aliments à larges échelles,
- de la conservation d'aliments potentiellement contaminés par congélation sur des périodes de plus de 6 semaines,
- de la persistance des souches chez des opérateurs agroalimentaires ou des établissements de soins.

Ceci souligne également la nécessité d'avoir une plus grande exhaustivité des souches d'autocontrôles permettant d'accroître la capacité de détection des sources de contamination du système de surveillance français.

4.3. EPIDEMIES

Aucune épidémie ne fut répertoriée en France en 2017 (Tableau 6).

Tableau 6. Tableau récapitulatif des épidémies françaises de 1992 à 2017

Année	Nombre de cas	Aliments	Durée de l'épidémie
1992	279	Langue de porc en gelée	10 mois
1993	38	Rillettes	3,5 mois
1995	36	Brie	4,5 mois
1997	14	Pont-l'Évêque	4,5 mois
1999	4	Époisses	2 mois
2000	10	Rillettes	4 mois
2000	32	Langue de porc en gelée	3,5 mois
2002	11	Saucisse à tartiner (tartinette)	3 mois
2003	4	Mortadelle	2 mois
2012	11	Brie	3 mois
2013	3	Fromage de Brebis	2 mois
2013	11	Quenelle	4 mois
2014	6	Produits de charcuterie, Morbier contaminés par l'environnement agro-alimentaire	3 mois
2015	8	Pélardon	2 mois
2015	3	Saint Nectaire	1 mois
2015	2	Saint Nectaire	1 mois
2015	13	Andouille – Tour de France	8 mois
2015	2	Produit corse	1,6 mois
2016	22	Reblochon	4 mois

4.4. ALERTES-PRODUITS DGAL

Ces alertes et investigations ont pour but d'identifier des souches alimentaires qui ont des caractéristiques microbiologiques similaires à celles des souches à l'origine d'infections. Les aliments faisant l'objet de ces alertes peuvent avoir diverses origines, avoir été commercialisés ou non, enregistrés par la DGAL sous la forme (i) d'une non-conformité *Listeria*, (ii) d'une notification par une Direction Départementale de Protection des Populations ou (iii) d'une notification via le réseau européen des alertes RASFF.

En 2017, 821 souches (2016 : 770) ont été adressées au CNRL dans le cadre des alertes-produits DGAL, DDPP et des Armées de 2017. Ces souches incluaient 761 souches alimentaires, 58 souches d'environnements agroalimentaires, 1 souche d'animal et 1 souche sans information d'un autocontrôle. Le détail et investigations sur ces alertes produits sont détenus par la DGAL, la DGCCRF et Santé Publique France.

En cas d'alerte RASFF, le CNRL sur la demande de la DGAL essaie d'obtenir de ses homologues étrangers les séquences génomiques assemblées ou les reads des souches *Lm* issues des aliments incriminés.

En 2017, 1072 notifications ont été faites à la Commission Européenne pour des denrées alimentaires avec des pathogènes alimentaires dont 91 concernaient *L. monocytogenes* (Tableau 7) comprenant 23 notifiées par la France et 12 par 4 pays étrangers ayant un lien avec un produit français (https://ec.europa.eu/food/safety/rasff_en).

En 2017, 98% (comme en 2015, 2016) des souches issues d'aliments isolées dans le cadre des alertes-produits et envoyées au CNRL parce qu'elles ont été identifiées comme appartenant à l'espèce *Lm* par le laboratoire expéditeur ont été confirmées comme *Lm* par le CNRL.

La répartition par groupe PCR des 804 souches de *Lm* isolées d'aliments et d'échantillons environnementaux dans le cadre des alertes-produits était la suivante :

- Groupe PCR IIa (sérovats 1/2a et 3a) : 569 souches (71% ; 65% en 2016)
- Groupe PCR IIb (sérovats 1/2b, 3b et 7) : 57 souches (7% ; 6% en 2016)
- Groupe PCR IIc (sérovats 1/2c et 3c) : 62 souches (8% ; 14% en 2016)
- Groupe PCR IVb (sérovats 4b, 4d et 4e) : 116 souches (14% ; 15% en 2016)
- Groupe PCR IVb-V1 (sérovat 4b) : 0 souche (0% ; <1% en 2016)
- Groupe PCR L (sérovats 4a, 4ab, 4c) : 0 souche (0% ; <1% en 2016)

Tableau 7. Information des alertes RASFF notifiées en 2017 par la France ou reliées à un produit distribué ou circulant en France concernant *Listeria monocytogenes*.

Classification RASFF	Date de notification	Référence RASFF	Pays notifiant	Sujet	Catégorie de produits alimentaires
information for attention	28/12/2017	2017.2231	France	<i>Listeria monocytogenes</i> (180 CFU/g) in pork and horse saveloy from France	meat and meat products (other than poultry)
alert	28/12/2017	2017.2226	France	<i>Listeria monocytogenes</i> (presence /25g) in goat cheese from France	milk and milk products
information for attention	26/12/2017	2017.2213	France	<i>Listeria monocytogenes</i> (900 CFU/g) in enoki mushrooms from South Korea, via the Netherlands	fruits and vegetables
alert	20/12/2017	2017.2190	France	<i>Listeria monocytogenes</i> (<10 CFU/g) in various chilled puff pastry products from France	prepared dishes and snacks
information for follow-up	10/11/2017	2017.1933	Ireland	<i>Listeria monocytogenes</i> (presence /25g) in brie cheese from France, portioned in Ireland	milk and milk products
information for attention	31/10/2017	2017.1817	France	<i>Listeria monocytogenes</i> (<10 CFU/g) in mixed rind soft cheese made from pasteurized milk from France	milk and milk products
alert	26/10/2017	2017.1771	France	<i>Listeria monocytogenes</i> (<10 CFU/g) in raw milk goat's cheese from France	milk and milk products
information for attention	20/10/2017	2017.1713	France	<i>Listeria monocytogenes</i> (180 CFU/g) in cooked wild shrimps from Spain	crustaceans and products thereof
alert	10/10/2017	2017.1640	Ireland	<i>Listeria monocytogenes</i> (presence /25g) in organic cheddar cheese from Ireland	milk and milk products
information for attention	28/09/2017	2017.1546	France	<i>Listeria monocytogenes</i> (460 CFU/g) in chilled marinated salmon from Poland	fish and fish products
alert	31/08/2017	2017.1319	Denmark	<i>Listeria monocytogenes</i> (240 CFU/g) in chilled cold smoked salmon from Poland	fish and fish products
alert	23/08/2017	2017.1267	France	<i>Listeria monocytogenes</i> (420; <400 CFU/g) in raw milk goat's cheese from France	milk and milk products
alert	18/08/2017	2017.1244	Belgium	<i>Listeria monocytogenes</i> (presence /25g) in chilled cooked duck products from Belgium	poultry meat and poultry meat products
alert	03/08/2017	2017.1156	France	<i>Listeria monocytogenes</i> (<10 CFU/g) in chilled sausages for spreading from France	meat and meat products (other than poultry)
alert	20/07/2017	2017.1058	France	<i>Listeria monocytogenes</i> (<10 CFU/g) in chilled sliced ham from Italy, via Monaco	meat and meat products (other than poultry)
alert	13/07/2017	2017.1025	France	<i>Listeria monocytogenes</i> (110 CFU/g) in raw cow's milk cheeses from France	milk and milk products
alert	06/07/2017	2017.0971	France	<i>Listeria monocytogenes</i> (44000 CFU/g) in raw milk goat's cheese from France	milk and milk products
alert	30/06/2017	2017.0936	Belgium	<i>Listeria monocytogenes</i> (<10 CFU/g) in chilled smoked duck breast from Belgium	poultry meat and poultry meat products
alert	29/06/2017	2017.0925	Netherlands	<i>Listeria monocytogenes</i> (> 1500 CFU/g) in raw milk sheep's cheese from France	milk and milk products
information for attention	28/06/2017	2017.0922	Netherlands	<i>Listeria monocytogenes</i> in raw sheep's milk cheese from France	milk and milk products
alert	27/06/2017	2017.0912	France	<i>Listeria monocytogenes</i> (90 CFU/100g) in raw milk Neufchâtel cheese from France	milk and milk products
alert	23/06/2017	2017.0903	Belgium	<i>Listeria monocytogenes</i> (80 CFU/g) in chilled smoked sliced duck breast from Belgium	poultry meat and poultry meat products
information for attention	01/06/2017	2017.0763	France	<i>Listeria monocytogenes</i> (<10 CFU/g) in chilled scallops from the United Kingdom	bivalve molluscs and products thereof
alert	31/05/2017	2017.0759	Netherlands	<i>Listeria monocytogenes</i> (> 15000 cfu/g) in canned truffle from Italy and cheese with truffle from the Netherlands	fruits and vegetables
alert	27/04/2017	2017.0540	France	<i>Listeria monocytogenes</i> (240 CFU/g) in chilled smoked halibut from France	fish and fish products
information for follow-up	25/04/2017	2017.0522	Netherlands	<i>Listeria monocytogenes</i> (390 CFU/100g) in frozen beef trimmings from the Netherlands	meat and meat products (other than poultry)

Classification RASFF	Date de notification	Référence RASFF	Pays notifiant	Sujet	Catégorie de produits alimentaires
information for attention	27/03/2017	2017.0387	France	<i>Listeria monocytogenes</i> (6600 CFU/g) in chilled smoked salmon from France	fish and fish products
alert	07/03/2017	2017.0293	France	<i>Listeria monocytogenes</i> (970 CFU/g) in chilled nems from France	prepared dishes and snacks
alert	13/02/2017	2017.0192	France	<i>Listeria monocytogenes</i> (1500 CFU/g) in raw goat milk cheese from France	milk and milk products
information for attention	09/02/2017	2017.0170	France	<i>Listeria monocytogenes</i> (480 CFU/g) in cooked breaded pig feet from France	meat and meat products (other than poultry)
information for attention	09/02/2017	2017.0171	Netherlands	<i>Listeria monocytogenes</i> (<10 CFU/g) in chilled smoked salmon from Poland, with raw material from Norway, via France	fish and fish products
alert	01/02/2017	2017.0138	France	<i>Listeria monocytogenes</i> (>15000 CFU/g) in pork rillettes from France	poultry meat and poultry meat products
alert	16/01/2017	2017.0066	Ireland	<i>Listeria monocytogenes</i> (presence /25g) in cooked crab meat from Ireland	crustaceans and products thereof
alert	13/01/2017	2017.0058	France	<i>Listeria monocytogenes</i> (180 CFU/g) in raw milk cheese from Spain	milk and milk products
information for attention	13/01/2017	2017.0062	France	<i>Listeria monocytogenes</i> (980 CFU/g) in smoked salmon from Poland, with raw material from Norway	fish and fish products

En 2017, les complexes clonaux de *Lm* les plus fréquents à l'origine d'alertes-produits en France sont, par ordre décroissant, le CC121, le CC9, le CC26, le CC8, le CC7, le CC6, le CC199 et le CC1.

4.5. ALERTES PRODUITS DGCCRF

Les alertes-produits provenant de la DGCCRF ou de ses laboratoires survenus en 2017 ont donné lieu à la réception au CNRL de 25 souches. Ces alertes sont mises en place lorsque des échantillons alimentaires ne répondent pas aux critères microbiologiques réglementaires pour *Lm* lors de l'application du plan de contrôle et de surveillance pour *Listeria* et lors d'inspections (<http://www.economie.gouv.fr/dgccrf/contamination-des-aliments-a-distribution-par-listeria-monocytogenes>). Depuis 2012, ces alertes-produits DGCCRF sont transformées en alertes-produits DGAL.

4.6. ENQUETES DES FORMES NEUROMENINGEES (ENQUETES « FRIGO »)

Cette enquête est menée par les différents partenaires de la Cellule *Listeria*, coordonnée par SPF. Elle est mise en place depuis août 2001. Lors de la notification d'un cas de listériose neuroméningée, les investigations par la DDPP consistent à réaliser des prélèvements d'aliments dans le réfrigérateur ou l'environnement du patient (avec son accord ou celui de sa famille). Le CNRL réalise un groupage PCR et un typage par cgMLST sur les souches alimentaires prélevées et celle du patient et compare ensuite les type cgMLST des souches afin d'identifier l'aliment à l'origine du cas et transmet les résultats à la Cellule *Listeria*.

En 2017, 87% (83/95 ; 2016 : 87%) des listérioses neuroméningées ont été soumises à cette d'enquête, chiffre stable après l'augmentation régulière depuis 2006 (59%). 44 (1996 : 24) investigations ont été suivies d'enquêtes locales donnant lieu à des prélèvements dans le réfrigérateur du patient.

En 2017, parmi les 13 cas pour lesquels des souches ont été isolées du réfrigérateur du patient ou de ses lieux d'achats, à 2 (1996 : 10/24) reprises, la souche du patient était similaire en cgMLST à la souche isolée des aliments de son réfrigérateur (45).

Ainsi, les prélèvements à domicile effectués pour les cas de listérioses neuroméningées sont un complément utile à la DO et permettent, dans environ 15% des cas où *Lm* est isolé, d'identifier rapidement la source de contamination.

4.7. «URGENT INQUIRIES» DE L'ECDC

En 2017, le CNRL a été informé d'alertes-produits communautaires soit par l'ECDC au moyen de la plateforme EPIS, soit par la DGAI au moyen du réseau RASFF (alertes-produits), soit par l'OMS/FAO au moyen du réseau INFOSAN. À la demande de la DGAI, le CCOMS-CNRL récupère auprès d'opérateurs agroalimentaires étrangers, les souches d'alertes-produits européennes ou internationales, ainsi que les souches des lots incriminés ayant circulé sur le territoire français. Ces souches sont alors introduites dans la surveillance nationale. Les homologues étrangers du CNRL peuvent aussi lui demander l'envoi de souches ou de génomes dans le cadre de cas groupés ou d'épidémies déclarés par la France ou de RASFF.

En 2017, le CNRL a investigué 8 « urgent inquiries » par cgMLST (4 en 2016) de l'ECDC (communiquées sur la base EPIS). Dans chaque cas, en lien avec SPF, le CNRL communique sur EPIS une synthèse des souches d'origines humaine et alimentaire du même cgMLST Type que la souche/les souches investiguées.

L'urgent inquiry UI-426 a donné à un article : *Chjorring S, Gillesberg Lassen S, Jensen T, Moura A, Kjeldgaard JS, Muller L, Thielke S, Leclercq A, Maury MM, Tourdjman M, Donguy MP, Lecuit M, Ethelberg S, Nielsen EM. 2017. Cross-border outbreak of listeriosis caused by cold-smoked salmon, revealed by integrated surveillance and whole genome sequencing (WGS), Denmark and France, 2015 to 2017. Euro Surveill 22.*

L'urgent inquiry UI-444 a donné lieu à une publication Rapid Risk assessment (RRA, A. leclercq co-auteur) sur le site de l'ECDC: *Multi-country outbreak of Listeria monocytogenes PCR serogroup IVb, MLST ST6* (https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/RRA-Listeria-monocytogenes-2017_0.pdf)

Aucun cas humain survenu en France n'a été relié à des souches de ces alertes-produits internationales. **Cependant, une souche d'autocontrôle français a permis d'élucider l'investigation européenne UI-444 démontrant l'intérêt du typage des souches d'autocontrôles dans la surveillance des *Listeria*.**

4.8. ENQUETE JUDICIAIRE

Depuis 2013, on note une demande accrue auprès de SPF de restitution de rapports individuels d'investigations autour de formes neuroméningées. Ces demandes émanaient soit d'autorités judiciaires dans le cadre de procédures intentées par un cas ou son entourage, soit de particuliers souhaitant obtenir les résultats des investigations réalisées à leur domicile. Ces demandes impliquent le CNRL pour l'analyse microbiologique, SPF pour l'analyse épidémiologique et la DGAI pour les investigations menées concernant l'origine de la contamination alimentaire.

5. ACTIVITES DE RETRO-INFORMATION, DE FORMATION ET DE CONSEIL

Le CNRL a également pour mission la mise à jour et la diffusion des connaissances sur *Listeria* et la listériose

- auprès du grand public, et notamment pour les personnes à risque;
- auprès des professionnels de santé et du secteur agro-alimentaire.

Le CNRL/CCOMS des *Listeria* dispose d'une collection d'articles papier de 1956 à 2000 sur *Listeria* et un accès aux bases de données en ligne pour les articles de 2000 à nos jours, ainsi qu'une collection d'ouvrages de référence et de données historiques. Les chercheurs, étudiants, praticiens ou hygiénistes qui en font la demande peuvent consulter ce centre de documentation. Chaque année, le CNR procure environ 30 documents pour des chercheurs ou praticiens ou opérateurs agro-alimentaires.

5.1. CONSEIL ET EXPERTISE AUX PROFESSIONNELS DE SANTE

5.1.1. Enseignements, Formations, Accueil de stagiaires

Les membres du CNRL animent chaque année de multiples formations microbiologiques médicales et agro-alimentaires : diplômes universitaires médicaux, formation médicale initiale des obstétriciens et infectiologues, séminaires de formation continue au sein de services hospitalo-universitaires d'Obstétrique, de Médecine Interne ou de Maladies Infectieuses sur différents sujets ayant trait à la listériose.

En 2017, Caroline Charlier a donné les enseignements suivants :

- Staff Médecine Interne Beaujon : Listériose actualités;
- DU Ethique, Social et Humanitaire Paris 5. « Infections et grossesse : description et enjeux » 1H30, 2015-17;
- DU Infection et grossesse Paris 11. « Listériose ». 1H, 2015-18.

5.1.2. Accueil de stagiaires

En 2017, le CNRL a :

- continué d'accueillir le Dr. Alexandra MOURA (depuis 2014), chercheur post-doctorante dont le projet s'intitule « **Génomique des populations des souches de *Listeria monocytogenes*** » ;
- accueilli pour un stage de Licence « **Typage de souches du Costa Rica. Apprentissage des techniques de typage** » du 16 Janvier au 15 mars 2017, une étudiante du Costa Rica, Mme Maria José GIRALT ZUNIGA dans le but d'établir un système de surveillance des *Listeria* au Costa Rica.

5.1.3. Liste des guides élaborés

Leclercq A, Charlier-Woerther C, Disson O, Jacquet C, Martin P, Rocourt J, Lecuit M. Chapitre *Listeria monocytogenes*. In: Précis de Bactériologie clinique, ESKA (ed), *Sous-Presses*.

Leclercq A, Charlier-Woerther, C. Kayal, S. 2017. Chapitre *Listeria*. In. Traité EMC Biologie Médicale Elsevier (ed.).

Charlier C, Lecuit M. 2018. Chapitre 68 : Listériose. In : Maladies infectieuses et tropicales. E. Pilly, 26^e édition, Paris, France.

Lourenço J, Leclercq A, Lecuit M et Charlier C. Listériose. 2017. Encyclopédie Médico-Chirurgicale. Sous presse.

Leclercq A, Le Monnier A. 2018. Chapitre 67 : *Listeria monocytogenes*. In : REMIC – Référentiel en microbiologie médicale, 6^{eme} édition, Société Française de Microbiologie, Paris, France.

5.1.4. Diffusion des données de surveillance et des productions du CNRL

5.1.4.1. Retro-informations aux partenaires

Le retour d'information prend plusieurs formes :

1. Compte-rendu détaillé des analyses effectuées pour chaque souche envoyée au laboratoire expéditeur. En cas d'atypies sur la souche ou l'observation médicale, le laboratoire expéditeur est contacté par l'un des responsables pour échanges d'informations.
2. Publication des formes atypiques de listérioses.
3. Communications orales à de multiples congrès nationaux et internationaux des travaux de recherche du CNRL (réunion multidisciplinaire de chimiothérapie infectieuse (RICAI) en 2017).

Depuis 2007, le rapport d'activité du CNRL (version web) après sa validation par le comité des CNR est mis en ligne sur notre site web (Adresse <http://www.pasteur.fr/cnr/listeria> rubrique « actualités-Rapports ») et adressé à tous les institutionnels investis dans la surveillance de la listériose ainsi qu'à toute personne en faisant la demande.

5.1.4.2. Information des professionnels de santé : Site Internet

Le CNRL/CCOMS des *Listeria* dispose d'un site internet en français et anglais : (<http://www.pasteur.fr/cnr/listeria>), qui est incorporé dans le site des CNR de l'Institut Pasteur formant le LREMS (Laboratoire de Référence et d'Expertise Multisite) qui a été créé en 2005 et est au minimum actualisé tous les 6 mois ainsi qu'évalué par le COFRAC lors des audits d'accréditation.

Il contient des informations sur les missions du CNRL, ses rapports d'activité, la listériose, des recommandations pour les professionnels de santé, les laboratoires (dont les éléments de conseils méthodologiques décrits en annexe B), les opérateurs agro-alimentaires et patients, des liens vers les sites des partenaires du CNRL, et des informations pratiques comme la manière d'envoyer les souches au CNRL (contrat de prestation, feuilles de renseignements).

5.1.5. Activité de conseil aux professionnels de santé

En 2017, le CNRL a reçu environ 290 demandes d'information par e-mail (listeria@pasteur.fr) (~6/semaine) et environ 540 appels téléphoniques (~10/semaine) (cf. point 4.7 "Prestations de conseils" de la norme NF EN ISO 15189) et point 4.4. "Revue de contrat" de la norme NF EN ISO 17025). Cette activité de conseils a été évaluée pour la partie médicale par les évaluateurs techniques COFRAC en Janvier 2017.

Par ailleurs, de nombreux biologistes et cliniciens ayant participé à l'étude MONALISA sollicitent le CNRL pour des conseils médicaux à propos des patients inclus dans l'étude.

Professionnels de santé

- demandes de renseignements concernant l'envoi de souche
- demandes de conseils microbiologiques (prélèvements biologiques à réaliser, isolement, identification, typage des souches, et/ou interprétation des résultats)
- demandes d'aide au diagnostic (stratégie diagnostic, réalisation d'antibiogramme, diagnostic complémentaire par PCR et/ou sérologie)
- demandes de conseils thérapeutiques (ex : alternative thérapeutique en cas d'allergie aux β -lactamines)

Professionnels de l'alimentaire

- demandes de renseignements concernant l'envoi de souche et les alertes-produits
- demandes de conseils microbiologiques (prélèvements à réaliser, isolement, identification, typage des souches, et/ou interprétation des résultats)
- information sur la génomique et le cgMLST

- demandes relatives au management de la qualité au CNRL, (procédures et démarches, gestion des non-conformités et/ou erreurs d'aiguillage des souches)

Particuliers

- demandes de conseil de femmes enceintes (prévention, aliments à risque)
- demandes de conseils diététiques de personnes présentant des facteurs de risque

Scientifiques et étudiants

- demandes de stage de formation
- demandes d'informations et de conseils sur les techniques utilisées au CNRL
- demandes d'article et/ou de documentation sur le genre *Listeria* et sur l'épidémiologie de la listériose

5.2. CONSEIL ET EXPERTISE AUX AUTORITES SANITAIRES

Veille Internet

Le CNRL/CCOMS des *Listeria* est abonné à plusieurs réseaux d'alertes de santé humaine et alimentaire. Les cadres du CNRL participent au Réseau de Microbiologistes Médicaux (R2M) afin de répondre, le cas échéant, à toutes questions spécifiques sur la listériose ou toutes demandes de bibliographie sur ce sujet. Le CNRL répertorie l'ensemble des sites Internet en langue française afin de solliciter des modifications de données erronées, ajouter un complément d'informations ou effectuer un lien avec le site Internet du CNRL. Le CNRL effectue également une veille de la consultation des termes *Listeria*/listérioses sur Google et Twitter et des nouvelles publications associées à ce terme sur le web pour détecter un phénomène anormal non rapporté et le rapporter à la cellule *Listeria*.

Expertises dans des comités nationaux, européens ou internationaux

Les responsables du CNRL ont participé, en tant qu'experts ou conseillers, à différentes instances : ECDC groupe *Listeria*, groupe de travail permanent de la Coordination des Laboratoires de Référence et d'Expertise (Institut Pasteur), Réseau de Microbiologistes Médicaux (R2M), Comité Européen de Normalisation en microbiologie de la chaîne alimentaire CEN TC275/WG6, Comité français Afnor V08B, Comité International de normalisation en microbiologie des aliments ISO TC34/SC9, Comité d'experts spécialisés CES « BIORISK » de l'ANSES.

En 2017, A. Leclercq a participé aux groupes d'experts ANSES sur « l'attribution des sources des maladies infectieuses d'origine alimentaire » et le CNRL a été auditionné dans ce cadre sur la surveillance et la disponibilité des données et métadonnées disponibles en France.

En 2017, la DGAI (C. DANAN) a demandé au CNRL d'assister deux étudiantes d'AgroParisTech en Master 2 pour l'établissement d'une fiche web de la DGAI sur *La listériose* avec les liens vers les données publiques dans le secteur alimentaire, vétérinaire et humain qui a été publiée le 24/08/17 à l'adresse <http://agriculture.gouv.fr/la-listeriose>. Cette page web regroupe : la présentation générale, les acteurs et les modalités de la surveillance de la listériose en France et les principales recommandations pour la prévention de la listériose.

Conseil auprès de Ministères

Par sa participation à la cellule *Listeria*, le CNRL est en contact presque quotidien avec les services concernés des Ministères de l'Economie, de l'Agriculture et de la Santé et de Santé Publique France. Il contribue à la préparation d'avis de l'ANSES.

Conseil auprès de l'ECDC, la FAO, l'OMS

Le CNRL participe avec SPF et les Ministères concernés, aux réponses aux demandes émises par les systèmes EPIS, RASFF, INFOSAN sur des épidémies, des cas groupés ou des produits alimentaires contaminés. Le CNRL participe aux réunions et à la rédaction de documents de l'ECDC et de l'OMS sur *Listeria*, et le laboratoire héberge le CCOMS *Listeria*.

5.3. CONSEIL ET EXPERTISE POUR D'AUTRES CIBLES (MEDIAS, GRAND PUBLIC, ETC.)

Expertise de méthodes ou de déclarations d'invention ou de projets industriels

En 2017, les responsables du CNRL ont participé aux réunions sur la révision des normes françaises, européennes et internationales pour les *Listeria* en microbiologie de la chaîne alimentaire. Ils ont également participé à l'harmonisation européenne (ECDC/EFSA) et internationale (Pulsenet) des méthodes de groupage PCR et de typage moléculaire par génomique des *Lm*.

Expertise de publications et de projets scientifiques

En 2017, le CNRL a participé à l'examen d'articles dans des journaux nationaux et internationaux à comités de lecture (PLOS One, PLOS Outbreak, Epidemiology and Infection, Clinical Microbiology and Infection, Lancet Infectious Diseases, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, International Journal of Food Microbiology, Foodborne Pathogens and Disease, Journal of Functional Foods, Genes, Journal of Food Protection, J. Applied Microbiology, Letter Applied Microbiology, Revue de Médecine interne). Il a également expertisé des projets scientifiques.

C. Charlier est éditeur pour la section « Maladies Infectieuses » de la Presse médicale et A. Leclercq est membre du comité éditorial de « Journal of Food Protection » et « Food Analytical methods », éditeur-associé de l'International Journal of Food Microbiology pour un numéro spécial : Validation of reference method.

Expertise pour des médias

Sperat-Czar A (Interview A. Leclercq et M. Tourdjman). *Listeria* : Seniors, le maillon faible. Profession fromager, 76 :35-37. (2017) Mars-Avril.

Cérou M (Interview A. Leclercq). *Listeria* : la surveillance fait un bond en avant. Process alimentaire, 1345 :89-90. (2017) Mars.

6. TRAVAUX DE RECHERCHE ET PUBLICATIONS EN LIEN DIRECT AVEC L'ACTIVITE DU CNRL

Le CNRL développe son expertise microbiologique en lien avec l'Unité de Biologie des Infections qui l'héberge à l'Institut Pasteur. Ceci permet de développer des projets de recherche à l'interface entre les activités de surveillance du CNRL et les activités de recherche fondamentale de l'Unité.

Chaque année, l'Institut Pasteur attribue un budget propre au CNRL et au CCOMS en complément de celui octroyé par SPF pour le CNRL. Outre son utilisation pour le financement de personnels, d'équipements et de frais de fonctionnement, ce budget permet de développer des projets de recherche qui sont à l'interface entre les activités de surveillance du CNR et les activités de recherche de l'Unité.

Les paragraphes en anglais correspondent soit aux résumés des publications, soit aux actes de colloques non disponibles sur le web.

6.1. ACTIVITES DE RECHERCHE EN COURS EN 2017

6.1.1. Contributions aux études épidémiologiques

Real-Time Whole-Genome Sequencing for Surveillance of Listeria monocytogenes, France

En collaboration avec S. Brisse, Unité de génomique évolutive des microbes, Institut Pasteur, M. Tourdjman, H. De Valk (SPF), M.-P. Donguy (DGAI)

Poster A. Moura, A. Leclercq, H. Bracq-Dieye, P. Thouvenot, G. Vales, M. Maury, H. De Valk, A. Criscuolo, V. Enouf, S. Brisse, M. Lecuit. 2016. Genome-based surveillance of L. monocytogenes in France in 2015. ISOPOL, Paris, 2016, Poster 58.

Article publié: Moura A, Tourdjman M, Leclercq A, Hamelin E, Laurent E, Fredriksen N, Van Cauteren D, Bracq-Dieye H, Thouvenot P, Vales G, Tessaud-Rita N, Maury MM, Alexandru A, Criscuolo A, Quevillon E, Donguy MP, Enouf V, de Valk H, Brisse S, Lecuit M. 2017. Real-Time Whole-Genome Sequencing for Surveillance of Listeria monocytogenes, France. Emerg Infect Dis 23:1462-1470.

Abstract: During 2015-2016, we evaluated the performance of whole-genome sequencing (WGS) as a routine typing tool. Its added value for microbiological and epidemiologic surveillance of listeriosis was compared with that for pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), the current standard method. A total of 2,743 *Listeria monocytogenes* isolates collected as part of routine surveillance were characterized in parallel by PFGE and core genome multilocus sequence typing (cgMLST) extracted from WGS. We investigated PFGE and cgMLST clusters containing human isolates. Discrimination of isolates was significantly higher by cgMLST than by PFGE ($p < 0.001$). cgMLST discriminated unrelated isolates that shared identical PFGE profiles and phylogenetically closely related isolates with distinct PFGE profiles. This procedure also refined epidemiologic investigations to include only phylogenetically closely related isolates, improved source identification, and facilitated epidemiologic investigations, enabling identification of more outbreaks at earlier stages. WGS-based typing should replace PFGE as the primary typing method for *L. monocytogenes*.

Cross-border outbreak of listeriosis caused by cold-smoked salmon, revealed by integrated surveillance and whole genome sequencing (WGS), Denmark and France, 2015 to 2017

En collaboration avec M. Tourdjman et E. Laurent (SPF), M.-P. Donguy (DGAI)

Article publié: Schjorring S, Gillesberg Lassen S, Jensen T, Moura A, Kjeldgaard JS, Muller L, Thielke S, Leclercq A, Maury MM, Tourdjman M, Donguy MP, Lecuit M, Ethelberg S, Nielsen EM. 2017. Cross-border outbreak of listeriosis caused by cold-smoked salmon, revealed by integrated surveillance and whole genome sequencing (WGS), Denmark and France, 2015 to 2017. Euro Surveill 22.

Abstract: In August 2017, an outbreak of six listeriosis cases in Denmark was traced to cold-smoked salmon, using epidemiological investigations and whole-genome sequencing (WGS) analyses. Exchange of genome sequences allowed identification in France of a food isolate from a salmon-derived product and a human isolate from 2016 within the same cgMLST cluster as the Danish isolates (L2-SL8-ST8-CT771). The salmon product came from a third European Union country. WGS can rapidly link human cases and food isolates across Europe.

Retrospective validation of whole genome sequencing-enhanced surveillance of listeriosis in Europe

En collaboration avec I. Van de Wall et J. Takkinen (ECDC)

Article accepté : Van Walle I, Torgny Björkman J, Cormican M, Dallman T, Mossong J, Moura A, Pietzka A, Ruppitsch W, European *Listeria* WGS typing group (dont Lecuit M, Leclercq A), Takkinen J. 2018. Retrospective validation of whole genome sequencing-enhanced surveillance of listeriosis in Europe. *Eurosurveillance* (In Press).

Abstract: Invasive infection of *Listeria monocytogenes* (*Lm*) is a potentially severe foodborne disease. The trend in annually reported case counts has been increasing since 2008, and in 2015, 2224 cases were reported in the European Union/European Economic Area (EU/EEA). In this study, we aim to validate both the microbiological and epidemiological aspects of an envisaged EU/EEA wide surveillance system enhanced by routine whole genome sequencing (WGS), using core genome multilocus sequence typing (cgMLST). WGS was performed on isolates from 2726 cases from 27 EU/EEA countries spanning the period 2010-2015. Quality control tests for contamination, mixed *Lm* cultures and sequence quality classified 97.7% of isolates as acceptable for analysis, with a minimum average coverage of the genome before and after trimming of respectively 55x and 45x producing almost always good quality sequences. Assessment of the cgMLST variation between six different pipelines revealed virtually no difference between SPAdes or Velvet assemblers among closely related sequences. Assembly-based analysis was associated with slightly less variation than reads-based analysis, suggesting that a surveillance system based on exchange of assembled sequences might be preferable over one based on sequence reads. Epidemiological concordance, based on a set of 152 isolates from 19 confirmed outbreaks and a cluster cutoff of 7 allelic differences, had >95% sensitivity for each of two different cgMLST schemes of 1748 and 1701 loci and PPV between 58-68%. The proportion of sporadic cases was slightly below 50% in this dataset. Of the remaining isolates, around one third were in clusters involving more than one country. These often spanned several years, and we therefore do not think time limits should be used for hypothesis generation during outbreak investigations except for analytical studies. In addition, the detection of multi-country clusters was on average several months earlier when pooling the data at EU/EEA level compared to first detection at national level. Together, the findings in this study provide a good basis for a comprehensive EU/EEA wide WGS-enhanced surveillance of listeriosis.

6.1.2.Méthodes de diagnostic et caractérisation des souches atypiques

Souches de Listeria monocytogenes non hémolytiques

En collaboration avec M. Scotti et J.A. Vazquez-Boland, University of Edinburgh, Ashworth Laboratories, Edinburgh, Royaume-Uni.

Poster H. Bracq-Dieye, V. Chenal-Francisque, M. Maury, L. Han, A. Leclercq, M. Scotti, O. Disson, E. Gouin, J.A. Vazquez-Boland, M. Lecuit. 2016. Characterization of non-hemolytic *Listeria monocytogenes* isolates, impact on virulence. ISOPOL, Paris, 2016, Poster 179

Article publié: Maury MM, Chenal-Francisque V, Bracq-Dieye H, Han L, Leclercq A, Vales G, Moura A, Gouin E, Scotti M, Disson O, Vazquez-Boland JA, Lecuit M. 2017. Spontaneous Loss of Virulence in Natural Populations of *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* 85(11).

Abstract: The pathogenesis of *Listeria monocytogenes* depends on the ability of this bacterium to escape from the phagosome of the host cells via the action of the pore-forming toxin listeriolysin O (LLO). Expression of the LLO-encoding gene (*hly*) requires the transcriptional activator PrfA, and both *hly* and *prfA* genes are essential for *L. monocytogenes* virulence. Here, we used the hemolytic activity of LLO as a phenotypic marker to screen for spontaneous virulence-attenuating mutations in *L. monocytogenes*. Sixty nonhemolytic isolates were identified among a collection of 57,820 confirmed *L. monocytogenes* strains isolated from a variety of sources (0.1%). In most cases (56/60; 93.3%), the nonhemolytic phenotype resulted from nonsense, missense, or frameshift mutations in

prfA Five strains carried hly mutations leading to a single amino acid substitution (G299V) or a premature stop codon causing strong virulence attenuation in mice. In one strain, both hly and gshF (encoding a glutathione synthase required for full PrfA activity) were missing due to genomic rearrangements likely caused by a transposable element. The PrfA/LLO loss-of-function (PrfA(-)/LLO(-)) mutants belonged to phylogenetically diverse clades of *L. monocytogenes*, and most were identified among nonclinical strains (57/60). Consistent with the rare occurrence of loss-of-virulence mutations, we show that prfA and hly are under purifying selection. Although occurring at a low frequency, PrfA(-)/LLO(-) mutational events in *L. monocytogenes* lead to niche restriction and open an evolutionary path for obligate saprophytism in this facultative intracellular pathogen.

6.1.3. Etudes épidémiologiques, microbiologiques et cliniques

Isolément de Listeria monocytogenes d'urines: analyse de 14 cas

Poster: F. Danion, A. Leclercq, M. Maury, M. Lecuit, C. Charlier. 2016. Isolation of *L. monocytogenes* from urine: analysis of 14 cases. ISOPOL, Paris, 2016, Poster 199

Article: Danion F, Maury MM, Leclercq A, Moura A, Perronne V, Leotard S, Dary M, Tanguy B, Bracq-Dieye H, Thouvenot P, Lecuit M, Charlier C. 2017. *Listeria monocytogenes* isolation from urine: a series of 15 cases and review. Clin Microbiol Infect 23:583-585.

Abstract: *Listeria monocytogenes* (*Lm*) is a foodborne pathogen typically responsible for severe infections in immune-depressed patients, like septicemias, neurological or maternal–neonatal infections. The identification of *Lm* in the urine has never been extensively assessed.

Surveillance of listeriosis in France is based on mandatory reporting of cases to the Institut de Veille Sanitaire and voluntary submission of *Lm* strains to the National Reference Center for *Listeria* (NRCL). We undertook a retrospective study of cases reported to the NRCL from 01/1995 to 03/2016 with *Lm* in urine cultures. Isolates were genotyped.

Fourteen patients with *Lm* isolated from urine were identified. Eleven were men. Median age was 78 years (range [40-90]). All patients were older than 65 or had immunosuppressing condition(s) (cancer (n=5), alcoholism (n=4) diabetes mellitus, autoimmune disorder or cirrhosis (n=2, each). Six patients reported prostatic lesions (adenoma (n=4) or adenocarcinoma (n=2)); two reported previous or concomitant uropathies: previous renal tuberculosis and enterovesical fistula (n=1, each).

Clinical presentation identified 3 groups. Seven cases (50%) had *Lm* urinary tract infections: prostatitis (n=6) or pyelonephritis (n=1); they reported fever with no alternative cause and urinary tract symptoms or high PSA levels; symptoms all resolved under amoxicillin therapy (15-28 days). *Lm* was the only pathogen identified, except in the case with enterovesical fistula.

Two patients (14%) reported fever without urinary symptom or ultrasound evidence for prostatic/kidney infection. They both had concomitant positive blood culture for *Lm*: *Lm* isolation in this context likely reflects concomitant bacteremia rather than primary urinary tract infection.

Five patients (36%) were completely asymptomatic. Blood cultures were negative (3/3). No infection was reported after 2-months follow-up despite therapeutic abstention (n=4) or ineffective treatment with nitrofurantoin (n=1). *Lm* isolation in urine in this context likely reflects fecal contamination, rather than actual infection.

Isolation of *Lm* in the urine may reflect 3 distinct conditions: (1) urinary tract infection that can be considered as a rare but actual entity, (2) complicating septicemia and (3) asymptomatic colonization/contamination. It requires careful evaluation and work-up that should include blood cultures.

Diagnostic et traitement des endophtalmies à Listeria monocytogenes

Etude réalisée avec l'ECDC

Article : Chersich MF, Takkinen J, Charlier C, Leclercq A, Adams PE, Godbole G, Altmeyer U, Friesema IH, Labbé Sandelin L, Jenkin L, Fontana L, Aldigeri R, Venter F, Luchters SM, Lecuit M, Cimino L. 2016. Diagnosis and Treatment of *Listeria monocytogenes* Endophthalmitis: A Systematic Review. Ocul Immunol Inflamm. 2017 Feb 1:1-10. doi: 10.1080/09273948.2016.1276788

Abstract

PURPOSE: Describe patient characteristics, treatment, and vision outcomes of *Listeria monocytogenes* endophthalmitis, an exceedingly rare form of listeriosis.

METHODS: *L. monocytogenes* endophthalmitis cases in human adults, located through Medline (32) and from disease surveillance centers (11). *L. monocytogenes* conjunctivitis and keratitis were excluded.

RESULTS: Most cases occurred in 2000-2015 (22/43), and almost all in Europe or North America (40/43). Patients were a median 61 years, 57% male (24/42) and half were immunosuppressed. Median days from entering care to diagnosis was 8 (IQR = 5-17). Only four were exogenous infections. *L. monocytogenes* was identified in 31/35 of anterior eye fluid samples (89%). Antibiotic regimens varied markedly (mostly ≥ 3 drugs). At diagnosis, most were blind in the affected eye (85%, 28/33), only a third regained normal vision (12/36). Older patients had poorer outcomes.

CONCLUSIONS: Cases increased over time. Diagnostic delays were common and visual impairment often refractory to treatment, especially in older adults. The condition's rarity and variation in treatment makes it difficult to identify optimum therapy.

Listeria monocytogenes-associated respiratory infections: a study of 38 consecutive cases

Poster : Journées Nationales Infectiologies Saint Malo 2017

Article : Morgand M, Leclercq A, Maury MM, Bracq-Dieye H, Thouvenot P, Vales G, Lecuit M, Charlier C. Clin Microbiol Infect. 2018 Mar 13. pii: S1198-743X(18)30209-X. doi: 10.1016/j.cmi.2018.03.003.

Objectives: *Listeria monocytogenes* (Lm) is a foodborne human pathogen responsible for severe infection, including septicemia, neurolisteriosis, maternal-fetal and focal infections. Little is known about Lm-associated respiratory tract or lung infections.

Methods: Retrospective study of culture-proven cases of Lm pleural infections and pneumonia reported to the French National Reference Center for Listeria from January 1993 to August 2016.

Results: Thirty-eight consecutive patients with pleural infection (n=32), pneumonia (n=5), or both (n=1) were studied. 71% were men. Median age was 72 (range 29-90). Two patients presented with concomitant neurolisteriosis. All patients but one reported at least one immunosuppressive condition (97 %), with a median number of 2 (range, 0-5), including 29% (8/28) with current exposure to immunosuppressive therapy and 50% (17/34) with ongoing neoplasia. Seventy-five percent (21/28) reported previous pleural or pulmonary disease. Antibiotic therapy mostly consisted in amoxicillin (72%), associated with aminoglycoside in 32%. Chest tube drainage was performed in 7/19 (37%) of patients with empyema. Twenty five percent (7/30) of patients required intensive care management. In-hospital mortality reached 35% and occurred after a median time interval of 4 days (range, 1-33). Three patients had recurrence of empyema (time interval of 1 week to 4 months after treatment completion). Altogether, only 13/31 patients diagnosed with Lm-respiratory infection (42%) experienced uneventful outcome at 2-year follow-up.

Conclusion: Lm is a rare but severe cause of pneumonia and pleural infection in older immunocompromised patients, requiring prompt diagnosis, adequate management and follow-up.

6.1.4. Etudes de la virulence

Etude comparative de la neurolistériose humaine et du ruminant (Sinergia, Swiss National Science Foundation)

En collaboration avec J. Frey et A. Oeverman (Institute of veterinary Bacteriology, University of Bern, Switzerland) et S. Brisse (Unité Biodiversité et Epidémiologie des bactéries pathogènes)

Neurolisteriosis is a common and frequently fatal complication of *Listeria monocytogenes* infection in human and ruminants. It has a high impact on human and animal health, but only little is known about its pathogenesis. Intriguingly, neurolisteriosis apparently occurs in various phenotypes. In ruminants only rhombencephalitis occurs, whilst humans may be affected by meningitis, meningoencephalitis, brain abscesses and rhombencephalitis.

This project aims to study comparatively human and ruminant neurolisteriosis on the level of the host (neurolisteriosis phenotypes), pathogen (microbiology) and experimental models (molecular pathophysiology of neurotropism). The correlation of human and ruminant clinical and neuropathology data with genetic data of the

field strains and their investigation in experimental models will allow to identify the factors that determine neurotropism and invasion. To this end, we will exploit the similarities and differences in ruminant and cattle neurolisteriosis that indicate the ability of *L. monocytogenes* to reach the brain by various strategies. Unravelling how *L. monocytogenes*, a well-established model pathogen, targets the central-nervous system via various pathways is crucial to understand the principles of brain invasion by intracellular microbes.

This project is expected to enable the future development of new therapeutic strategies that aim to prevent *L. monocytogenes* from invading and spreading within the central-nervous system. Additionally, it will generate important information on the molecular epidemiology and phylogeny of human and ruminant *L. monocytogenes* neurotropic strains. This will enable future studies investigating the spread of neurotropic strains in the livestock population, environment and food and will facilitate surveillance and prevention of infection in both ruminants and humans.

6.1.5. Taxonomie

Le CNRL a caractérisé deux nouvelles espèces: *L. thailandensis* en cours de publication et *L. costaricensis*.

Listeria costaricensis sp. nov.

Poster : A. Leclercq, A. Moura, N. Tessaud-Rita, H. Bracq-Dieye, P. Thouvenot, G. Vales, M. Maury, G. Aquilhon, M. Lecuit. 2016. *Listeria thailandensis* sp. nov. Isolated from food in Thailand. ISOPOL, Paris, 2016, Poster 63

Article publié: Nunez-Montero K, Leclercq A, Moura A, Vales G, Peraza J, Pizarro-Cerda J, Lecuit M. 2018. *Listeria costaricensis* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 68:844-850.

Abstract: A bacterial strain isolated from a food processing drainage system in Costa Rica fulfilled the criteria as belonging to the genus *Listeria*, but could not be assigned to any of the known species. Phylogenetic analysis based on the 16S rRNA gene revealed highest sequence similarity with the type strain of *Listeria floridensis* (98.7 %). Phylogenetic analysis based on *Listeria* core genomes placed the novel taxon within the *Listeria fleishmannii*, *L. floridensis* and *Listeria aquatica* clade (*Listeria sensu lato*). Whole-genome sequence analyses based on the average nucleotide blast identity (ANI<80 %) indicated that this isolate belonged to a novel species. Results of pairwise amino acid identity (AAI>70 %) and percentage of conserved proteins (POCP>68 %) with currently known *Listeria* species, as well as of biochemical characterization, confirmed that the strain constituted a novel species within the genus *Listeria*. The name *Listeria costaricensis* sp. nov. is proposed for the novel species, and is represented by the type strain CLIP 2016/00682(T) (=CIP 111400(T)=DSM 105474(T)).

6.1.6. Participation à la maîtrise agroalimentaire

Contamination by Salmonella spp., Campylobacter spp. and Listeria spp. of most popular chicken- and pork-sausages sold in Reunion Island

En collaboration avec E. Cardinale (CIRAD)

Article publié: Trimoulinard A, Beral M, Henry I, Atiana L, Porphyre V, Tessier C, Leclercq A, Cardinale E. 2017. Contamination by *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. and *Listeria* spp. of most popular chicken- and pork-sausages sold in Reunion Island. *Int J Food Microbiol* 250:68-74.

Abstract: One of the most popular meat products of the local "cuisine" is sausage composed with 100% chicken or 100% pork. In this study, we aimed to determine the presence of *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. and *Listeria* spp. in chicken- and pork-sausages, quantify *Salmonella* spp. population and identify the factors that could be associated with contamination in the outlets. Two hundred and three batches of pork and chicken sausages were randomly collected from 67 local outlets (supermarkets, groceries and butcher shops). *Salmonella* spp. was detected in 11.8% (95% confidence interval (CI): [10.0; 13.5]) of samples, *Campylobacter* spp. in 1.5% [0.7; 4.2] and *Listeria monocytogenes* in 5.9% [4.4; 7.3]. Most probable number of *Salmonella* spp. varied between 6 cfu per gram to 320cfu per gram. *Salmonella* serotypes isolated from pork and chicken sausages were *S. Typhimurium* (45.8%), *S. London* (20.8%), *S. Derby* (16.7%), *S. Newport* (8.33%), *S. Blockley* (4.2%) and *S. Weltevreden* (4.17%). Using a logistic (mixed-effect) regression model, we found that *Salmonella* spp. contamination was positively associated with

sausages sold in papers or plastic bags and no control of rodents. Chicken sausages were associated with a decreasing risk of *Salmonella* contamination. *Listeria monocytogenes* contamination was positively associated with the presence of fresh rodent droppings in the outlet and negatively when the staff was cleaning regularly their hands with soap and water or water only. All the sampled outlets of Reunion Island were not equivalent in terms of food safety measures. Increasing awareness of these traders remains a cornerstone to limit the presence of *Salmonella* spp. and *Listeria* spp. in sausages, particularly in a tropical context (high temperature and humidity).

6.1.7. Etude de la résistance aux antibiotiques et tolérance aux biocides

Le CNR étudie l'apport de la génomique en complément de l'analyse phénotypique de l'antibiogramme. Sur 23 antibiotiques investigués et selon les données d'antibiogrammes, seulement 3 peuvent être estimés en termes de résistance avec une approche de génomique.

Le CNR valide dans les outils de sa plateforme BIGSdb une recherche des gènes responsables du mécanisme de tolérance de *L. monocytogenes* au chlorure de benzalkonium.

6.2. LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS DE 2017

6.2.1. Publications nationales

Watier L., Augustin JC, Carlin F, David J, Fravalo P, Guillier L, Jourdan-Da Silva N, Leclercq A, Le Hello S, Mughini-Gras L, Pavo N, Villena I, Cuzzucoli D, Theboul A, Kooh P, Sanaa M. 2017. « Evaluation des risques biologiques dans les aliments » et Groupe de travail « Attribution des sources des maladies infectieuses d'origine alimentaire ». 2017. Avis de l'ANSES – Saisine N°2015-SA-0162 - Attribution des sources des maladies infectieuses d'origine alimentaire, Partie 1 : Revue des méthodes et inventaire des données. Anses, Maisons-Alfort.

6.2.2. Publications internationales

Charlier C, Perrodeau E, Leclercq A, Cazenave B, Pilimis B, Henry B, Lopes A, Maury MM, Moura A, Goffinet F, Dieye HB, Thouvenot P, Ungeheuer MN, Tourdjman M, Goulet V, de Valk H, Lortholary O, Ravaut P, Lecuit M, group Ms. 2017. Clinical features and prognostic factors of listeriosis: the MONALISA national prospective cohort study. Lancet Infect Dis 17:510-519.

Chersich MF, Takkinen J, Charlier C, Leclercq A, Adams PE, Godbole G, Altmeyer U, Friesema IHM, Labbe Sandelin L, Jenkin L, Fontana L, Aldigeri R, Venter F, Luchters SMF, Lecuit M, Cimino L. 2017. Diagnosis and Treatment of *Listeria monocytogenes* Endophthalmitis: A Systematic Review. Ocul Immunol Inflamm doi:10.1080/09273948.2016.1276788:1-10.

Danion F, Maury MM, Leclercq A, Moura A, Perronne V, Leotard S, Dary M, Tanguy B, Bracq-Dieye H, Thouvenot P, Lecuit M, Charlier C. 2017. *Listeria monocytogenes* isolation from urine: a series of 15 cases and review. Clin Microbiol Infect 23:583-585.

Maury MM, Chenal-Francisque V, Bracq-Dieye H, Han L, Leclercq A, Vales G, Moura A, Gouin E, Scortti M, Disson O, Vazquez-Boland JA, Lecuit M. 2017. Spontaneous Loss of Virulence in Natural Populations of *Listeria monocytogenes*. Infect Immun 85.

Moura A, Tourdjman M, Leclercq A, Hamelin E, Laurent E, Fredriksen N, Van Cauteren D, Bracq-Dieye H, Thouvenot P, Vales G, Tessaud-Rita N, Maury MM, Alexandru A, Criscuolo A, Quevillon E, Donguy MP, Enouf V, de Valk H, Brisse S, Lecuit M. 2017. Real-Time Whole-Genome Sequencing for Surveillance of *Listeria monocytogenes*, France. Emerg Infect Dis 23:1462-1470.

Nunez-Montero K, Leclercq A, Moura A, Vales G, Peraza J, Pizarro-Cerda J, Lecuit M. 2018. *Listeria costaricensis* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol 68:844-850.

Nwaiwu O, Moura A, Thouvenot P, Rees C, Leclercq A, Lecuit M. 2017. Draft Genome Sequences of *Listeria monocytogenes*, Isolated from Fresh Leaf Vegetables in Owerri City, Nigeria. *Genome Announc* 5.

Schjorring S, Gillesberg Lassen S, Jensen T, Moura A, Kjeldgaard JS, Muller L, Thielke S, Leclercq A, Maury MM, Tourdjman M, Donguy MP, Lecuit M, Ethelberg S, Nielsen EM. 2017. Cross-border outbreak of listeriosis caused by cold-smoked salmon, revealed by integrated surveillance and whole genome sequencing (WGS), Denmark and France, 2015 to 2017. *Euro Surveill* 22.

Stahl JP, Azouvi P, Bruneel F, De Broucker T, Duval X, Fantin B, Girard N, Herrmann JL, Honnorat J, Lecuit M, Mailles A, Martinez-Almoyna L, Morand P, Piroth L, Tattevin P, reviewing g. 2017. Guidelines on the management of infectious encephalitis in adults. *Med Mal Infect* 47:179-194.

Thouvenot P, Vales G, Bracq-Dieye H, Tessaud-Rita N, Maury MM, Moura A, Lecuit M, Leclercq A. 2018. MALDI-TOF mass spectrometry-based identification of *Listeria* species in surveillance: A prospective study. *J Microbiol Methods* 144:29-32.

Trimoulinard A, Beral M, Henry I, Atiana L, Porphyre V, Tessier C, Leclercq A, Cardinale E. 2017. Contamination by *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. and *Listeria* spp. of most popular chicken- and pork-sausages sold in Reunion Island. *Int J Food Microbiol* 250:68-74.

6.2.3.Communications nationales

Evolution normative et réglementaire. Desforges I, Leclercq A. Présentation orale. 17ème colloque bioMérieux Actualités et perspectives en Microbiologie Alimentaire, Paris, France, (2017) Octobre 17.

Maldi-Tof mass spectrometry-based identification of *Listeria* species in surveillance: A prospective study. Leclercq A. Présentation orale. Bruker Symposium, Paris, France, (2017) Décembre 20.

Pasteur International Bioresources network (PIBnet) : La nouvelle vision pour la santé publique: l'apport de PIBnet/P2M (exemple CNR *Listeria*). Enouf V. Présentation orale. 1^{er} journée scientifique MSD Avenir, Paris, France (2017) Novembre 29.

Actualités sur la Listériose. Charlier C. Présentation orale. 37^{ème} Réunion Interdisciplinaire de chimiothérapie anti-infectieuse, Paris Décembre 2017.

C. Charlier, S. Poirée, C. Delavaud, G. Khoury, C. Richaud, A. Leclercq, M. Lecuit. Imagerie cérébrale de la neurolistériose : série prospective de 71 dossiers neuroradiologiques. Poster COL01-02. 16^e Journées Nationales d'infectiologie. Nancy (2017) Juin.

Genome-based surveillance of *Listeria monocytogenes*. A. Moura. Présentation orale. 8eme Séminaire des CNR, Charenton-le-Pont, France (2017) novembre 16

The Contribution of whole-genome sequencing in food surveillance of *Listeria monocytogenes*. A. Moura. Présentation orale. Journée CNR-LNR, Saint-Maurice, France (2017) novembre 17

6.2.4.Communications internationales

Listeria invasion of host tissues: mechanisms and effects. M. Lecuit, Présentation orale. Excellence in Genetics and Immunology Seminar Series at McGill University, Montreal, Canada (2017) Janvier 23

New insights in the pathogenesis of *Listeria monocytogenes*. M. Lecuit, Présentation orale. National and International Seminar Series, Departments of Molecular Biology, Clinical Microbiology, WCMU, Umea University, Umea, Sweden (2017) Mars 3

Prevalence of *Listeria* spp. in Costa Rica and genomic characterization of *Listeria monocytogenes* isolates. Núñez-Montero K, Giralt M, Vales G, Moura A, Leclercq A, Pizarro-Cerdá J, Lecuit M, Peraza J. Poster, 6th International workshop Advances in Science and technology of bioresources, Pucon, Chile, (2017) décembre 29-30

6.2.5.Conférences sur invitations

Listérioses actualités 2017.C Charlier. RICAI. Paris, France (2017)

Listériose 2017. C. Charlier, Présentation orale. Journées de Microbiologie Clinique. Paris, France (2017) Janvier 12

Listeria invasion of host tissues: mechanisms and effects. M. Lecuit, Présentation orale. Séminaire du Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan, Toulouse, France (2017) Janvier 12

New insights in the listeriosis pathophysiology. M. Lecuit, Présentation orale. Journée de Recherche Translationnelle, Center for Translational Research, Institut Pasteur, Paris France (2017) Mars 9

Listeria invasion of host tissues: mechanisms and effects. Excellence in Genetics and Immunology Seminar Series at McGill University, Montreal, Canada (2017) Janvier 23

6.2.6.Membres de comité d'organisation ou modérateur de congrès

Caroline Charlier, Marc Lecuit membres du comité de programme de la RICAI (Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse), Paris, France (2017) Décembre

Modérateur RICAI session CNRs Marc Lecuit

7. COOPERATION AVEC LES LABORATOIRES DE SANTE ANIMALE, D'HYGIENE ALIMENTAIRE, ENVIRONNEMENTAUX

7.1. COOPERATION

Le CNRL et le LNRI ont expertisé et conseillé la DGAI sur des méthodes commerciales d'isolement de *Lm* dans les aliments validées Afnor Certification selon la norme NF EN ISO 16140-2 ayant abouti à la mise au point d'un jeu de souches alimentaires de *Lm* représentatif de la diversité française à utiliser dans le cadre de la validation de méthodes en microbiologie de la chaîne alimentaire selon la norme NF EN ISO 16140-2.

Le CNRL participe au CES BIORISK de l'ANSES (A. Leclercq, membre du CES) comprenant le groupe de travail ANSES « Attribution des Sources des dangers » pour lequel le CNRL a été auditionné avec SPF et le LNR *Lm* et ayant abouti au rapport disponible à l'adresse suivante <https://www.anses.fr/fr/system/files/BIORISK2015SA0162Ra.pdf>.

A. Leclercq est membre du comité de thèse d'une doctorante de l'École Doctorale ABIES (Université Paris-Est), Mme Lena Fritsch, du LNRI sur « Caractérisation de la variabilité intra-spécifique des limites de croissance de *Listeria monocytogenes* à des températures basses et études des mécanismes d'adaptation au froid » sous la direction du Professeur J.C. Augustin (École Vétérinaire de Maisons-Alfort).

7.2. ECHANGES ENTRE LE CNR ET LE LNR

Les CNRL et le LNRI échangent les souches d'alertes produits (livraison trimestrielle par le CNRL).

Le CNRL est à la disposition du LNRI pour séquencer et typer des souches qu'il pourrait lui adresser.

Le CNRL échange avec l'EURL *Lm* et le LNRI sur l'antibiorésistance des souches de *L. monocytogenes* (S. Granier).

8. PROGRAMME D'ACTIVITE POUR LES ANNEES 2018-2019

Outre la poursuite des activités de surveillance et d'expertise, le programme de travail du CNRL pour les années 2018-2019 est le suivant :

Activités d'expertise :

- Continuité des activités mises en place ;
- Adaptation de l'activité en fonction des instructions de la cellule *Listeria* ;
- Développement d'une procédure d'urgence avec SPF afin de détecter le plus précocement possible tout épisode de cas groupés.

Typage et évolution des souches de *L. monocytogenes* :

- Optimisation (ajustement possible du cut-off des cas groupés) du core génome MLST (cgMLST) ;
- Etude de la dynamique des clones au sein des souches réceptionnées dans le cadre de la surveillance ;

Surveillance microbiologique :

- Détection de la résistance aux antibiotiques et aux antiseptiques, et détermination des mécanismes ;
- Etude de la saisonnalité de la listériose ;
- Analyse des souches atypiques de *Listeria* (souches de *Lm* non hémolytiques, *L. innocua* hémolytique possédant l'ilot de pathogénicité majeur de *Lm*).

Étude du lien entre exposition alimentaire / colonisation / infection :

- Détermination de la fréquence et de la nature des souches du portage de *Lm* ;
- Étude de la distribution des clones MLST et cgMLST dans les différents types d'aliments
- Suivi des clusters de souches alimentaires pour en comprendre les liens comme les matières premières communes, etc.

Aspects diagnostiques :

- Evaluation de la virulence des souches de *Lm*, et mise en évidence des caractéristiques génotypiques et phénotypiques permettant de stratifier la virulence.

Aspects thérapeutiques :

- Evaluation l'antibiorésistance des *Lm* ;
- Evaluation d'alternatives thérapeutiques dans le traitement de la neurolistériose.

Aspects cliniques :

- Etude des formes « non-classiques » de listériose
- Étude des formes cliniques en fonction du terrain (diabète, cancer, âge).

Aspects préventifs :

- Participation à l'élaboration de recommandations ciblées pour les différentes populations à risque.

Contribution aux réseaux de surveillance européens et internationaux :

- Participation à l'analyse des clusters rapportés à l'ECDC ou l'OMS ;
- Contribution avec SPF au reporting des données françaises à l'ECDC.

9. REFERENCES

1. Charlier C, Perrodeau E, Leclercq A, Cazenave B, Pilmis B, Henry B, Lopes A, Maury MM, Moura A, Goffinet F, Dieye HB, Thouvenot P, Ungeheuer MN, Tourdjman M, Goulet V, de Valk H, Lortholary O, Ravaud P, Lecuit M, group Ms. 2017. Clinical features and prognostic factors of listeriosis: the MONALISA national prospective cohort study. *Lancet Infect Dis* doi:10.1016/S1473-3099(16)30521-7.
2. Chersich MF, Takkinen J, Charlier C, Leclercq A, Adams PE, Godbole G, Altmeyer U, Friesema IHM, Labbe Sandelin L, Jenkin L, Fontana L, Aldigeri R, Venter F, Luchters SMF, Lecuit M, Cimino L. 2017. Diagnosis and Treatment of *Listeria monocytogenes* Endophthalmitis: A Systematic Review. *Ocul Immunol Inflamm* doi:10.1080/09273948.2016.1276788:1-10.
3. Charlier C, Poirée S, Delavaud C, Khoury G, Richaud C, Leclercq A, Hélénon O, Lecuit M. 2018. Imaging of human neurolisteriosis: a prospective study of 71 cases. *Clin Infect Dis* In Press.
4. Maury MM, Chenal-Francisque V, Bracq-Dieye H, Han L, Leclercq A, Vales G, Moura A, Gouin E, Scotti M, Disson O, Vazquez-Boland JA, Lecuit M. 2017. Spontaneous Loss of Virulence in Natural Populations of *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* 85.
5. Danion F, Maury MM, Leclercq A, Moura A, Perronne V, Leotard S, Dary M, Tanguy B, Bracq-Dieye H, Thouvenot P, Lecuit M, Charlier C. 2017. *Listeria monocytogenes* isolation from urine: a series of 15 cases and review. *Clin Microbiol Infect* 23:583-585.
6. Farfour E, Leto J, Barritault M, Barberis C, Meyer J, Dauphin B, Le Guern AS, Lefleche A, Badell E, Guiso N, Leclercq A, Le Monnier A, Lecuit M, Rodriguez-Nava V, Bergeron E, Raymond J, Vimont S, Bille E, Carboneille E, Guet-Revillet H, Lecuyer H, Beretti JL, Vay C, Berche P, Ferroni A, Nassif X, Join-Lambert O. Evaluation of the Andromas matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system for identification of aerobically growing Gram-positive bacilli. *J Clin Microbiol* 50:2702-7.
7. Nunez-Montero K, Leclercq A, Moura A, Vales G, Peraza J, Pizarro-Cerda J, Lecuit M. 2018. *Listeria costaricensis* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 68:844-850.
8. Thouvenot P, Vales G, Bracq-Dieye H, Tessaud-Rita N, Maury MM, Moura A, Lecuit M, Leclercq A. 2018. MALDI-TOF mass spectrometry-based identification of *Listeria* species in surveillance: A prospective study. *J Microbiol Methods* 144:29-32.
9. Moura A, Tourdjman M, Leclercq A, Hamelin E, Laurent E, Fredriksen N, Van Cauteren D, Bracq-Dieye H, Thouvenot P, Vales G, Tessaud-Rita N, Maury MM, Alexandru A, Criscuolo A, Quevillon E, Donguy MP, Enouf V, de Valk H, Brisse S, Lecuit M. 2017. Real-Time Whole-Genome Sequencing for Surveillance of *Listeria monocytogenes*, France. *Emerg Infect Dis* 23:1462-1470.
10. Moura A, Criscuolo A, Pouseele H, Maury MM, Leclercq A, Tarr C, Bjorkman JT, Dallman T, Reimer A, Enouf V, Larssonneur E, Carleton H, Bracq-Dieye H, Katz LS, Jones L, Touchon M, Tourdjman M, Walker M, Stroika S, Cantinelli T, Chenal-Francisque V, Kucerova Z, Rocha EP, Nadon C, Grant K, Nielsen EM, Pot B, Gerner-Smidt P, Lecuit M, Brisse S. 2016. Whole genome-based population biology and epidemiological surveillance of *Listeria monocytogenes*. *Nat Microbiol* 2:16185.
11. Anonyme. 2015. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. EFSA, Parme, Italie Accessible à <http://ecdceuropa.eu/en/publications/Publications/zoonoses-trends-sources-EU-summary-report-2014.pdf>.
12. De Valk H, Tourdjman M, Leclercq A, Maury MM, Moura A, Chenal-Francisque V, Goulet V, Brisse S, Lecuit M. 2016. Changes in epidemiology and surveillance of listeriosis in France, abstr ISOPOL XIX, Paris, France, 14-17 June 2016.
13. Mook P, O'Brien SJ, Gillespie IA. 2011. Concurrent conditions and human listeriosis, England, 1999-2009. *Emerg Infect Dis* 17:38-43.

14. Pouillot R, Hoelzer K, Jackson KA, Henao OL, Silk BJ. 2012. Relative risk of listeriosis in Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet) sites according to age, pregnancy, and ethnicity. *Clin Infect Dis* 54 Suppl 5:S405-10.
15. Charlier C, Fevre C, Travier L, Cazenave B, Bracq-Dieye H, Podevin J, Assomany D, Guilbert L, Bossard C, Carpentier F, Cales V, Leclercq A, Lecuit M. 2014. *Listeria monocytogenes*-associated biliary tract infections: a study of 12 consecutive cases and review. *Medicine (Baltimore)* 93:e105.
16. Charlier C, Leclercq A, Cazenave B, Desplaces N, Travier L, Cantinelli T, Lortholary O, Goulet V, Le Monnier A, Lecuit M. 2013. *Listeria monocytogenes*-associated joint and bone infections: a study of 43 consecutive cases. *Clin Infect Dis* 54:240-8.
17. Chersich MF, Takkinen J, Charlier C, Leclercq A, Adams PE, Godbole G, Altmeyer U, Friesema IH, Labbe Sandelin L, Jenkin L, Fontana L, Aldigeri R, Venter F, Luchters SM, Lecuit M, Cimino L. 2017. Diagnosis and Treatment of *Listeria monocytogenes* Endophthalmitis: A Systematic Review. *Ocul Immunol Inflamm* doi:10.1080/09273948.2016.1276788:1-10.
18. Goulet V, Hebert M, Hedberg C, Laurent E, Vaillant V, De Valk H, Desenclos JC. 2012. Incidence of listeriosis and related mortality among groups at risk of acquiring listeriosis. *Clin Infect Dis* 54:652-60.
19. Hof H, Nichterlein T, Kretschmar M. 1997. Management of listeriosis. *Clin Microbiol Rev* 10:345-57.
20. Leclercq A, Chenal-Francisque V, Dieye H, Cantinelli T, Drali R, Brisse S, Lecuit M. 2011. Characterization of the novel *Listeria monocytogenes* PCR serogrouping profile IVb-v1. *Int J Food Microbiol* 147:74-7.
21. Disson O, Grayo S, Huillet E, Nikitas G, Langa-Vives F, Dussurget O, Ragon M, Le Monnier A, Babinet C, Cossart P, Lecuit M. 2008. Conjugated action of two species-specific invasion proteins for fetoplacental listeriosis. *Nature* 455:1114-8.
22. Jacquet C, Doumith M, Gordon JI, Martin PM, Cossart P, Lecuit M. 2004. A molecular marker for evaluating the pathogenic potential of foodborne *Listeria monocytogenes*. *J Infect Dis* 189:2094-100.
23. Maury MM, Tsai YH, Charlier C, Touchon M, Chenal-Francisque V, Leclercq A, Criscuolo A, Gaultier C, Roussel S, Brisabois A, Disson O, Rocha EP, Brisse S, Lecuit M. 2016. Uncovering *Listeria monocytogenes* hypervirulence by harnessing its biodiversity. *Nat Genet* 48:308-13.
24. Chenal-Francisque V, Maury MM, Lavina M, Touchon M, Leclercq A, Lecuit M, Brisse S. 2015. Clonogrouping, a Rapid Multiplex PCR Method for Identification of Major Clones of *Listeria monocytogenes*. *J Clin Microbiol* 53:3355-8.
25. Anonyme. 2007. Règlement (CE) no 1441/2007 de la Commission du 5 décembre 2007 modifiant le règlement (CE) no 2073/2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires. *Journal officiel des Communautés européennes* 0012 - 0029.
26. Angelidis AS, Kalamaki MS, Georgiadou SS. 2015. Identification of non-*Listeria* spp. bacterial isolates yielding a beta-D-glucosidase-positive phenotype on Agar *Listeria* according to Ottaviani and Agosti (ALOA). *Int J Food Microbiol* 193:114-29.
27. Muller A, Rychli K, Muhterem-Uyar M, Zaiser A, Stessl B, Guinane CM, Cotter PD, Wagner M, Schmitz-Esser S. Tn6188 - a novel transposon in *Listeria monocytogenes* responsible for tolerance to benzalkonium chloride. *PLoS One* 8:e76835.
28. Cotter PD, Draper LA, Lawton EM, Daly KM, Groeger DS, Casey PG, Ross RP, Hill C. 2008. Listeriolysin S, a novel peptide haemolysin associated with a subset of lineage I *Listeria monocytogenes*. *PLoS Pathog* 4:e1000144.
29. Lecuit M, Nelson DM, Smith SD, Khun H, Huerre M, Vacher-Lavenu MC, Gordon JI, Cossart P. 2004. Targeting and crossing of the human maternofetal barrier by *Listeria monocytogenes*: role of internalin interaction with trophoblast E-cadherin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:6152-7.
30. Lecuit M, Vandormael-Pournin S, Lefort J, Huerre M, Gounon P, Dupuy C, Babinet C, Cossart P. 2001. A transgenic model for listeriosis: role of internalin in crossing the intestinal barrier. *Science* 292:1722-5.

31. Morvan A, Moubareck C, Leclercq A, Herve-Bazin M, Bremont S, Lecuit M, Courvalin P, Le Monnier A. 2010. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* strains isolated from humans in France. *Antimicrob Agents Chemother* 54:2728-31.
32. Khen BK, Lynch OA, Carroll J, McDowell DA, Duffy G. 2014. Occurrence, Antibiotic Resistance and Molecular Characterization of *Listeria monocytogenes* in the Beef Chain in the Republic of Ireland. *Zoonoses Public Health* doi:10.1111/zph.12106.
33. Wilson A, Gray J, Chandry PS, Fox EM. 2018. Phenotypic and Genotypic Analysis of Antimicrobial Resistance among *Listeria monocytogenes* Isolated from Australian Food Production Chains. *Genes (Basel)* 9.
34. Hof H. 2013. Chemotherapy of *Listeria* infections. *GMS Infectious diseases* 1:1-10.
35. Charlier-Woerther C, Leclercq A, Lortholary O, Lecuit M. 2009. [Listeriosis, a rare but severe foodborne infection]. *Rev Prat* 59:905-11.
36. FAO, OMS. 2002. Exemple de la cellule "Listeria", abstr Conférence paneuropéenne sur la sécurité sanitaire et la qualité des aliments, document de séance de la délégation française, Budapest, Hongrie.
37. Roussel S., Leclercq A, Santolini A, Agbessi A, Chenal-Francisque, V. L, R. L, M., , Pihier N, Brisabois A. 2012. Surveillance des *Listeria monocytogenes* dans les aliments. . *Bull Epidemiol Hebdom Hors série*. 9 mai 2012:41-45.
38. Anonyme. 2008. Commission decision of 28 April 2008 amending Decision 2002/253/EC laying down case definitions for reporting communicable diseases to the Community network under Decision No 2119/98/EC of the European Parliament and of the Council, p 46-90.
39. Anonyme. 2002. Règlement (CE) No 178/2002 du parlement européen et du conseil du 28 janvier 2002 établissant les principes généraux et les prescriptions générales de la législation alimentaire, instituant l'Autorité européenne de sécurité des aliments et fixant des procédures relatives à la sécurité des denrées alimentaires. *Journal officiel des Communautés européennes*:1-24.
40. Goulet V, King LA, Vaillant V, de Valk H. 2013. What is the incubation period for listeriosis? *BMC Infect Dis* 13:11.
41. de Noordhout CM, Devleeschauwer B, Angulo FJ, Verbeke G, Haagsma J, Kirk M, Havelaar A, Speybroeck N. The global burden of listeriosis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 14:1073-82.
42. Leclercq A, Charlier C, Lecuit M. Global burden of listeriosis: the tip of the iceberg. *Lancet Infect Dis* 14:1027-8.
43. Lazarus C, Leclercq A, Lecuit M, Vaillant V, Coignard B, Blanchard H, Novakova I, Astagneau P. 2013. Probable nosocomial transmission of listeriosis in neonates. *J Hosp Infect* 85:159-60.
44. Tourdjman M, Leclercq A, Groleau C, Soyer L, Moura A, Laurent E, Donguy MP, Conan G, Legoff D, Brisse S, Lecuit M, De Valk H. 2016. Hospital-Acquired listeriosis outbreak linked to prolonged contamination of a hospital kitchen environment - France, 2013, abstr International Symposium on Problems of Listeriosis (ISOPOL) XIX, Paris, France.
45. Richard S, Oggioni C, Jacquet C, Laurent E, Lequerrec F, Quelquejeu N, Goulet V. 2004. Investigations autour de cas de listériose neuroméningée: bilan de 1è mois de fonctionnement. *Bull Epidemiol Hebdom* 9:35-36.
46. Haase JK, Didelot X, Lecuit M, Korkeala H, Achtman M. 2013. The ubiquitous nature of *Listeria monocytogenes* clones: a large-scale Multilocus Sequence Typing study. *Environ Microbiol* 16:405-16.
47. Haase JK, Murphy RA, Choudhury KR, Achtman M. Revival of Seeliger's historical 'Special *Listeria* Culture Collection'. *Environ Microbiol* 13:3163-71.
48. Ragon M, Wirth T, Hollandt F, Lavenir R, Lecuit M, Le Monnier A, Brisse S. 2008. A new perspective on *Listeria monocytogenes* evolution. *PLoS Pathog* 4:e1000146.
49. Chenal-Francisque V, Lopez J, Cantinelli T, Caro V, Tran C, Leclercq A, Lecuit M, Brisse S. Worldwide distribution of major clones of *Listeria monocytogenes*. *Emerg Infect Dis* 17:1110-2.
50. Leclercq A, Le Monnier A. 2015. *Listeria monocytogenes*, p 527-532. In *Microbiologie SFd (ed), Référentiel en microbiologie médicale (REMIC)*, vol 5.2, Paris, France.

51. Doumith M, Buchrieser C, Glaser P, Jacquet C, Martin P. 2004. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 42:3819-22.
52. Chenal-Francisque V, Charlier C, Mehvish S, Dieye H, Leclercq A, Courvalin P, Lecuit M. Highly Rifampin-Resistant *Listeria monocytogenes* Isolated from a Patient with Prosthetic Bone Infection. *Antimicrob Agents Chemother* 58:1829-30.
53. Anonyme. 2012. *European Manual of Clinical microbiology*, 1st ed. SFM & ESCMID, Paris, France.
54. Bourassa L, Butler-Wu SM. 2015. Chapter 2 - MALDI-TOF Mass Spectrometry for Microorganism Identification, p 37-85. In Sails A, Tang Y-W (ed), *Methods in Microbiology*, vol 42. Academic Press.
55. CLSI. 2016. M45. *Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria.*, 3rd ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
56. CLSI. 2018. M100. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*, 8th ed, Wayne, PA
57. Gholizadeh Y, Poyart C, Juvin M, Beretti JL, Croize J, Berche P, Gaillard JL. 1996. Serodiagnosis of listeriosis based upon detection of antibodies against recombinant truncated forms of listeriolysin O. *J Clin Microbiol* 34:1391-5.
58. Leber AL, Everhart K, Balada-Llasat JM, Cullison J, Daly J, Holt S, Lephart P, Salimnia H, Schreckenberger PC, DesJarlais S, Reed SL, Chapin KC, LeBlanc L, Johnson JK, Soliven NL, Carroll KC, Miller JA, Dien Bard J, Mestas J, Bankowski M, Enomoto T, Hemmert AC, Bourzac KM. 2016. Multicenter Evaluation of BioFire FilmArray Meningitis/Encephalitis Panel for Detection of Bacteria, Viruses, and Yeast in Cerebrospinal Fluid Specimens. *J Clin Microbiol* 54:2251-61.
59. von Allmen N, Endelmann A, Kuehn S. 2016. Performance comparison of the new filmarray meningitis/encephalitis panel with routine diagnostic methods. *J Clin Virol* 82:S33.
60. De Lappe N, Lee C, O'Connor J, Cormican M. 2014. Misidentification of *Listeria monocytogenes* by the Vitek 2 system. *J Clin Microbiol* 52:3494-5.

ANNEXE A : ORGANISATION DU CNR

A.1. MISSIONS DU CNR

Le Centre National de Référence des *Listeria* s'est engagé à assurer de l'année 2017 à l'année 2021 les missions définies par le décret n° 2016-806 du 16 juin 2016 relatif aux centres nationaux de référence pour la lutte contre les maladies transmissibles et l'arrêté du 16 juin 2016 fixant le cahier des charges des Centres nationaux de référence pour la lutte contre les maladies transmissibles complété par le cahier des charges spécifiques du CNR *Listeria* de Santé Publique France pour la période 2017-2021 (mandat du 1^{er} avril 2017 au 31 mars 2022).

Il sera en outre particulièrement demandé à ce CNR les missions suivantes :

1. Expertise

- en disposant d'une expertise des méthodes diagnostiques utilisées en santé humaine comme la sérologie ou les méthodes moléculaires de diagnostic rapide, et en contribuant au développement et à la validation de nouvelles méthodes diagnostiques utilisées en santé humaine ;
- en contribuant au développement des méthodes de typage ;
- en typant en routine par une méthode discriminante fondée sur le typage moléculaire ou génomique, les souches isolées de prélèvements humains qui lui sont adressées avec une nomenclature des souches basée sur cette méthode ;
- en typant en routine par une méthode discriminante fondée sur le typage moléculaire ou génomique les souches isolées de prélèvements non humains isolées lors d'investigations réalisées autour de cas de listériose humaine ;
- en étudiant la sensibilité aux antibiotiques des souches isolées chez l'homme, et en surveillant l'apparition de souches de sensibilité diminuée aux antibiotiques. En contribuant à l'étude des nouveaux mécanismes de résistance en collaboration avec le CNR Résistance aux antibiotiques ;
- en collaborant avec les laboratoires travaillant en santé animale et sur les aliments (échange d'informations, de souches, etc.), et notamment le LNR et LRUE (Anses).

2. Conseil

- pas d'exigences particulières par rapport au cahier des charges général.

3. Contribution à la surveillance épidémiologique, en lien avec l'agence nationale de santé publique

- par la recherche de l'exhaustivité des souches humaines en vue notamment de détecter les cas groupés ;
- en contribuant à l'investigation des cas groupés ;
- en contribuant aux systèmes de surveillance internationaux et en particulier européens notamment dans le cadre de l'application de la directive zoonoses 2003/99/CE.

4. Contribution à l'alerte

- en signalant à l'agence nationale de santé publique la survenue de cas groupés et de tout phénomène inhabituel : augmentation du nombre de cas (si dépassement d'un seuil défini en accord avec l'agence nationale de santé publique), modification des formes cliniques (répartition, modification de leur expression clinique, formes inhabituelles), apparition d'un nouveau phénotype de résistance, etc.

Au sein de l'Institut Pasteur, le CNRL fait partie du plan de continuité qui est une organisation minimale du CNRL permettant d'assurer la continuité de ses activités en période de crise sanitaire exceptionnelle. Elle permettrait au CNRL de conserver une autonomie de fonctionnement humain, matériel et de la maintenance de la collection.

A.2. PERSONNEL PERMANENT

Les effectifs

L'effectif du personnel du CNRL est présenté dans le Tableau 8.

Tableau 8. Personnel affecté au CNR des *Listeria*

Nom – Prénom	Libellé Emploi	ETP*	Organisme payeur
LECUIT Marc	Médecin, Chercheur, Responsable	0,2**	Université, APHP
LECLERCQ Alexandre	Ingénieur de recherche confirmé, Responsable-Adjoint	1	IP
MAURY Mylène	Ingénieur de recherche confirmé	0,5	IP
CHARLIER-WOERTHER Caroline	Médecin, Chercheur	0,2**	Université, APHP
THOUVENOT Pierre	Technicienne supérieure de laboratoire	1	IP
VALES Guillaume	Technicien supérieur de laboratoire	1	IP
BRACQ DIEYE Hélène	Technicienne supérieure de laboratoire	1	IP
ROZIER Marie-Claire	Secrétaire	0,5	IP
TOTAL Equivalent Temps Plein (ETP)		5,4	

*ETP Equivalent Temps Plein. Il s'agit du pourcentage de leur temps de travail affecté à l'activité CNR.

** Personnel non financé par SPF.

Les personnels du CNRL possèdent collectivement une expertise médicale clinique et en microbiologie clinique, une expertise en microbiologie et sécurité sanitaire des aliments, une expertise en microbiologie fondamentale et génomique. Les responsables ont enregistré leur déclaration publique d'intérêt.

Les techniciens sont déclarés à l'ARS Île-de-France dans le cadre de leur activité au CNRL. La secrétaire travaille à mi-temps pour le CNRL, participe à l'investigation de cas atypiques de listérioses (au suivi des correspondances avec les laboratoires pour recueillir les données clinico-biologiques) et assure l'enregistrement des métadonnées.

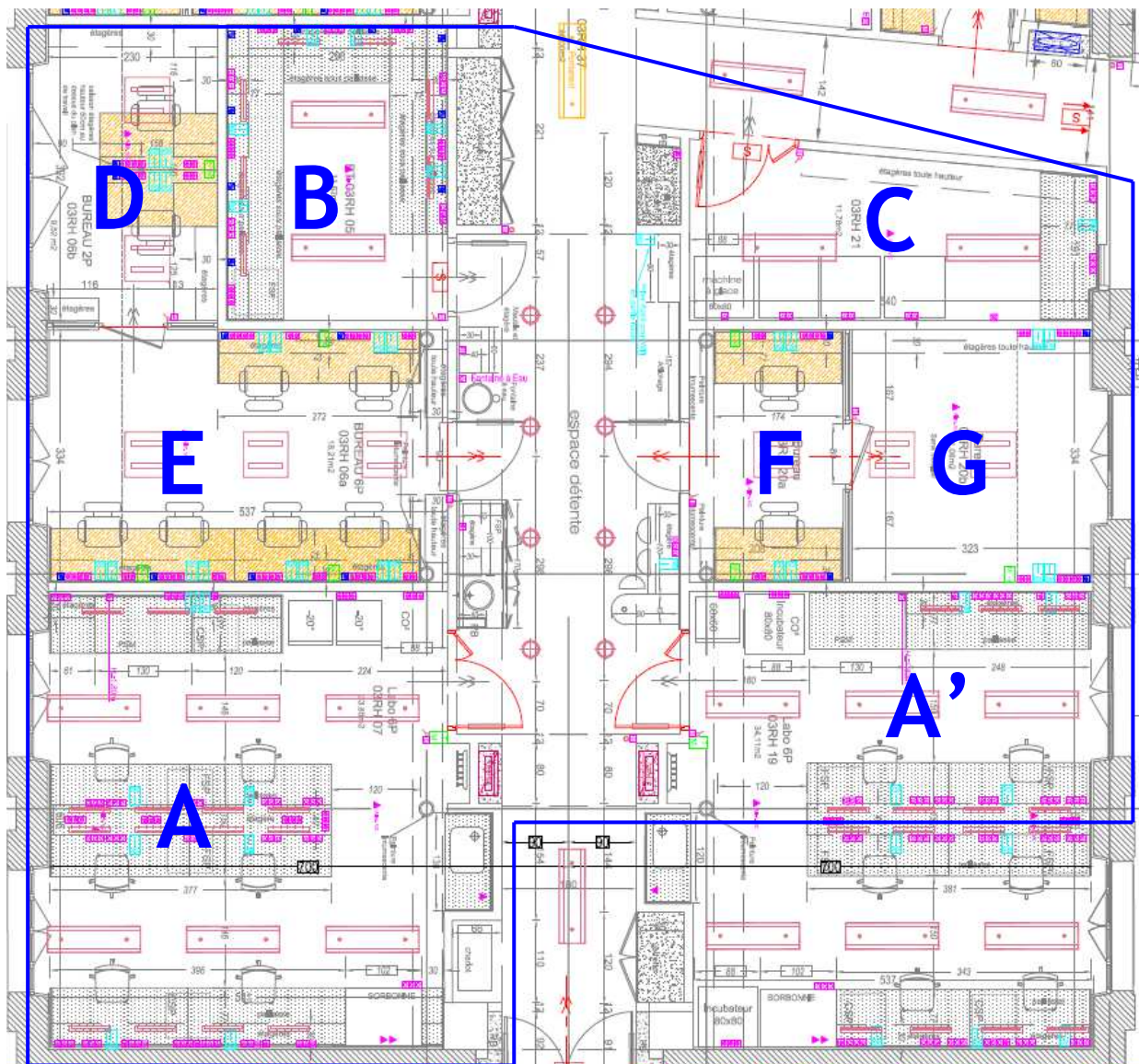
A.2. LOCAUX

Laboratoires et bureaux :

Le CNRL est hébergé depuis Octobre 2013 dans des locaux entièrement rénovés et conformes aux normes et réglementations en vigueur, au rez-de-chaussée haut du bâtiment Duclaux, aile Fourneau de l'Institut Pasteur, 28 rue du Dr. Roux, 75015 Paris.

Les pièces décrites sur la Figure 20 hébergent le CNRL et le Centre collaborateur de l'OMS des *Listeria* (CCOMS).

Figure 20. Plan des locaux du CNR des *Listeria*. Les Lettres bleues sont définies ci-dessous.



Locaux du CNRL (Figure 20) :

1 pièce laboratoire dédiée (A) et accès à un laboratoire de recherche et de réception des colis (A')

1 pièce de PCR partagée (B)

1 pièce d'incubation partagée (C)

1 pièce de pesée partagée

1 chambre froide partagée

3 pièces de bureaux dédiées (D, E, F)

1 bibliothèque /salle de réunion /Archives partagées (G)

1 laverie / salle des autoclaves / salle de préparation partagées avec d'autres CNR et Unités.

L'ensemble de ces pièces suit le processus de la marche en avant du propre vers le sale. Les pièces critiques (collection, etc.) sont sous surveillance de température et ont été incorporées au plan de continuité d'activité de l'Institut Pasteur.

A.3. EQUIPEMENT

L'ensemble des équipements scientifiques critiques pour les essais fait l'objet d'un suivi métrologique (Etalonnage-Cartographie et/ou vérification et d'un suivi continu des températures) ou d'une maintenance.

En 2017, l'Institut Pasteur a financé l'acquisition d'équipements de qualité « biologie biomédicale » dans le cadre de l'accréditation du CNRL et du respect des réglementations.

Matériel, équipements utilisés

- Matériel courant d'un laboratoire réglementaire de confinement L2 de microbiologie classique et de biologie moléculaire,
- 1 poste de sécurité microbiologique PSM II,
- 2 étuves,
- 3 bains thermostatés humides et 1 bain thermostaté à sec,
- 5 réfrigérateurs,
- 2 congélateurs,
- 1 congélateur -80°C,
- 2 centrifugeuses dont une pour les plaques,
- 1 lecteur automatique d'antibiogrammes Intersciences intégrant les référentiels CA-SFM, EUCAST et CLSI,
- 3 équipements d'électrophorèse en champs pulsés partagés avec d'autres CNR,
- 3 thermocycleurs en point final,
- 2 générateurs et cuves d'électrophorèse,
- 1 fax-copieur conformes à la réglementation sur les données de santé.

Equipements partagés

- 2 balances de pesée de précision,
- 1 inoculateur multipoint partagé,
- 1 système de prises de vues photographiques couplé à un ordinateur,
- 1 machine à glace,
- 1 photocopieuse-scanner conforme à la réglementation sur les données de santé,
- 1 thermocycleur temps réel partagé avec d'autres CNRs.

Equipement informatique

L'ensemble des équipements informatiques (7 ordinateurs, 3 imprimantes) est en location et géré par une société privée en contrat avec l'Institut Pasteur. Cette société est soumise à un contrat de confidentialité et de respect des exigences CNIL pour les données de santé publique et celles des correspondants du laboratoire. Le parc informatique est renouvelé tous les 3-4 ans.

Moyens extérieurs à la structure / Structures transversales

- Cellule d'Intervention Biologique d'Urgence : accès à un appareil de PCR en temps réel,
- Plateforme PIBnet/P2M séquençage (Illumina) et spectrométrie de masse Maldi-Tof (Bruker Daltonics),
- Animaleries de l'Institut Pasteur.

A.4. MAINTIEN, DETENTION ET DIFFUSION DE MATERIEL BIOLOGIQUE

Les différentes collections de souches bactériennes

Il existe 8 catégories de souches envoyées au CNRL :

1. **souches humaines** : souches ayant été à l'origine de cas cliniques.
2. **alerte sanitaire** : souches d'origine alimentaire ou issues de l'environnement de production de ces aliments, isolées dans le cadre d'investigation de cas groupés ou d'épidémiques et lors d'enquêtes ponctuelles autour d'un cas, à la demande de l'InVS, de la DGS, de la DGAL ou de la DGCCRF.
3. **alerte produit** : souches d'origine alimentaire ou issues de l'environnement de production de ces aliments, isolées dans le cadre de contrôles officiels ou autocontrôles faisant l'objet d'une alerte DGAL avec saisie, retrait, ou rappel de produit. Ces « alertes-produits » correspondent soit à des « non-conformités » aux critères réglementaires fixés pour les aliments (présence de *Lm* ou dépassement du seuil de 100 *Lm*/g-ml), soit à des situations considérées par la DGAL comme des menaces pour la santé publique.
4. **plans de surveillance/contrôle et contrôles officiels** placés sous la responsabilité de la DGAL et de la DGCCRF/DGDDI. Pour cette catégorie, dès lors que l'on se trouve en situation d'alerte telle que décrite au point 3 ci-dessus, la souche passe de la catégorie 4 à la catégorie 3.
5. **autocontrôles** : Les souches provenant de « clients » particuliers (industriels dans le cadre d'autocontrôles, laboratoires vétérinaires départementaux (LVD), laboratoires privés d'hygiène et de contrôle, etc).
6. **santé animale** : souches transmises par les LVD dans le cadre de la surveillance de la santé animale.
7. **études et projets de recherche** : souches isolées lors d'enquêtes, d'études sur un type de produit ou une filière particulière, ou dans le cadre de projets de recherches.
8. **environnement** : souches environnementales (eau, aliments pour animaux, sol, boues de station d'épuration, etc.)

Leur mise en collection permet de disposer d'une large banque de souches (associées à une banque de données scientifiques et clinico-biologiques), utile dans le cas d'investigations de clones épidémiques.

Le CNRL maintient et met à disposition sur demande motivée les souches types des espèces de *Listeria* et les souches de référence pour la sérotypie, ainsi que les sérums de sérotypie non commercialisés.

En 2017, le CNRL n'a pas reçu de demandes de distribution de souches ou de sérums mais a communiqué 650 souches d'alertes produits au LNRL. Le CNRL échange maintenant les séquences génomiques qu'ils possèdent comme lors des investigations d'épidémies comme décrit précédemment.

Souches types des espèces de *Listeria* et souches de référence pour la sérotypie

Le CNRL dispose des souches types complètement caractérisées des 18 espèces et 6 sous-espèces du genre *Listeria* (*L. monocytogenes*, *L. ivanovii* subsp. *ivanovii*, *L. ivanovii* subsp. *londoniensis*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. grayi* subsp. *grayi*, *L. grayi* subsp. *murrayi*, *L. rocourtiae*, *L. marthii*, *L. weihenstephanensis*, *L. fleischmannii* subsp. *fleischmannii*, *L. fleischmannii* subsp. *colorendiensis*, *L. floridensis*, *L. aquatica*, *L. cornellensis*, *L. riparia*, *L. grandensis*, *L. booriae*, *L. newyorkensis*, *L. costaricensis*), ainsi que des 15 souches de référence pour la sérotypie. Le CNR actualise sa collection avec les nouvelles espèces ou souches atypiques. Toutes ces souches sont conservées en géloses profondes dans des pièces à température contrôlée, et à -80°C en tubes de cryo-billes dans un congélateur sous alarme.

Collection de *Listeria* de l'Institut Pasteur (CLIP)

Chaque année, la collection du CNRL et du CCOMS s'incrémente d'environ 2000 nouvelles souches caractérisées par phénotypie, géosérotypage, PFGE et/ou génome. Une base de données Lagon regroupe l'ensemble des métadonnées sur ces souches (ainsi que des données cliniques minimales pour les isolats humains). Une base de données bionumerics et BIGsdb *Listeria* permettent de stocker les données de PFGE et de génomique associées aux

souches caractérisées par ces méthodes.

Cette collection, majoritairement française, mais également internationale (CCOMS) comportait 109 576 souches à la fin de l'année 2017. Ces souches sont d'origine clinique, alimentaire et environnementale, ainsi que vétérinaire ou de recherche. **Il s'agit d'une collection unique, de par son caractère prospectif et exhaustif**, qui centralise les souches humaines et alimentaires du système de surveillance français. Environ 68 019 souches de cette collection proviennent du CNRL. Elles sont conservées en géloses profondes dans une pièce à température contrôlée. Les souches d'origine humaine et, depuis janvier 2017, les souches alimentaires et de l'environnement sont conservées à -80°C en tubes de cryobilles dans un congélateur sous alarme. Le CNRL conserve également des souches isolées entre 1987 et 1992 provenant de la collection du CNRL alors hébergé au CHU de Nantes.

Special Listeria Culture Collection (SLCC)

Il s'agit de la collection de *Listeria* d'H.P.R. Seeliger (Würzburg, Allemagne) qui comporte plus de 5 000 souches isolées entre 1926 et 1985. L'intérêt de cette collection léguée au CCOMS *Listeria* est de contenir des souches anciennes, isolées depuis la première souche de *L. monocytogenes* (1921), de diverses origines géographiques, mais majoritairement France et Allemagne. Une base de données regroupe l'ensemble des données sur ces souches. Certaines sont actuellement utilisées dans le cadre de projets de recherche sur l'évolution et la biodiversité de *Listeria* (46, 47). Ces souches ont été caractérisées phénotypiquement et sont conservées en gélose profonde dans des pièces à température contrôlée.

Collection ILSI North America

Il s'agit de la collection du Technical Committee on Food Microbiology of ILSI North America contenant 43 isolats complètement caractérisés : 25 souches représentant la diversité des *Lm* et 18 souches d'épidémies, mises à disposition du CCOMS. Elles sont utilisables pour évaluer et valider des méthodes d'analyse ou de typage moléculaire et réaliser des essais de microbiologie prévisionnelle ou de croissance/survie. Elles sont conservées à -80°C en tube de cryobilles dans un congélateur sous alarme.

Collection du Centre de Ressource Biologique de l'Institut Pasteur (CRBIP) comprenant la Collection de l'Institut Pasteur

Il s'agit d'une collection sous management de la qualité (certifiée AFAQ NF 96 900) où le CNRL a déposé depuis 2004 sous contrat 152 souches qui constituent un échantillon représentatif des souches françaises humaines et non humaines du genre *Listeria* isolées de 1981 à nos jours (souches d'épidémies, de travaux de séquençage, de sérovars rares, de référence, types, etc.) ainsi que les souches de référence de taxonomie et de sérotypie. Des souches du genre *Listeria* et de l'espèce *monocytogenes* ayant des propriétés originales sont régulièrement mises en collection. La liste de ces souches est consultable à l'adresse web : http://catalogue.crbip.pasteur.fr/crbip_catalogue/faces/recherche_catalogue.xhtml et elles sont disponibles moyennant une somme couvrant les frais d'envoi et de maintien en collection sous assurance qualité.

Les bactériophages

Le CNRL possède la collection de bactériophages de lysotypie du Centre International de Lysotypie des *Listeria* (1982-1992 ; Institut Pasteur, Paris). Cette collection présente un intérêt du fait des nouveaux outils diagnostics fondés sur l'utilisation des phages, leur utilisation potentielle en thérapeutique et en sécurité microbiologique des denrées alimentaires telle que le phage P100 ayant obtenu l'autorisation GRAS (Generally Recognized As Safe) par la FDA aux USA.

Conditions de mise à disposition des collections

Le CNR valorise son savoir-faire et son expertise sur *Listeria* en mettant à disposition de tiers académiques et industriels des duplicatas des souches initialement reçues (à noter que la collection CNR est donc préservée).

L'accès au matériel biologique collecté dans le cadre de l'activité du CNR est conditionné :

- à ce que l'utilisation envisagée du matériel biologique réponde à un objectif de santé publique ;
- à la mise en place de documents contractuels spécifiques.

Ainsi, est exigée pour le transfert du matériel biologique et des données associées à des équipes extérieures, la mise en place à minima d'un accord de transfert de matériel biologique (MTA) ou d'un accord de collaboration selon la nature des interactions entre les deux parties. Suivant la nature industrielle ou académique du partenaire, ces accords donneront lieu ou non à une contrepartie financière, contrepartie financière qui reste limitée au remboursement des coûts induits pour l'obtention et la conservation du matériel biologique transféré. Ces accords ont notamment pour objet d'assurer le transfert de la détention physique du matériel au partenaire. Il est bien entendu que l'utilisation du matériel biologique par le tiers est strictement limitée au projet initial.

En termes de valorisation, l'Institut Pasteur s'assure que le CNR soit remercié ou associé dans chacune des publications et communications des résultats du projet. L'Institut Pasteur s'assure également dans certaines circonstances de la copropriété des résultats issus des travaux effectués sur le matériel biologique.

A tout le moins, les résultats du projet sont systématiquement communiqués au CNR.

Dossiers règlementaires

Le CNRL ne possède pas de collections d'échantillons humains et n'utilise pas d'organismes génétiquement modifiés, alors que l'Unité de Biologie des Infections également dirigée par Marc Lecuit et au sein de laquelle il est hébergé détient ces autorisations.

A.5. MAINTIEN ET DETENTION DES BASES DE DONNEES DU CNRL

Gestion, protection et sauvegarde de la base de données du CNRL

Les données épidémio-clinico-microbiologiques collectées pour chaque souche sont rassemblées dans le Système Informatique du Laboratoire (SIL) du CNRL. Il est en conformité avec les exigences règlementaires et normatives actuelles (norme NF EN ISO 15189 d'accréditation des laboratoires d'analyses de biologie médicale et de l'ASIP Santé (Agence des Systèmes d'Information Partagés de Santé)). Le CNRL a mis à jour sa déclaration de cette base de données auprès de la Commission Nationale Informatique et Libertés (CNIL) : Déclaration Normale, Numéro de déclaration 1474696v0, Récapitulé reçu de la CNIL en date du 19 janvier 2011.

Gestion des données clinico-biologiques : Logiciel LAGON® (EpiConcept)

Le logiciel LAGON® (EpiConcept) est utilisé depuis le 1er janvier 2005, et permet la gestion en temps réel des échantillons (suivi administratif, enregistrements des résultats techniques, etc.), l'anonymisation des données, leur archivage et une meilleure traçabilité. Ce logiciel est en cours de remplacement par un nouveau logiciel en cours d'achat pour le LREMS dont fait partie le CNRL afin d'intégrer le suivi en temps réel de l'échantillon par le laboratoire correspondant et la récupération de ses résultats sous une forme dématérialisée via une interface sécurisée web.

Base de spectres de masses de souches de *Listeria* : le CNRL a constitué depuis 2016 une base de données de plus de 2000 spectres de masse de *Listeria* obtenus par spectrométrie de masse Maldi-Tof sur équipement Bruker Daltonics. Cette base de données est gérée sous les logiciels MBT Compass Explorer (Bruker) et bionumerics version 7.6. par les techniciens du CNRL.

Base de données MLST : Après la publication d'une méthode de typage de *Lm* par multilocus sequence typing (MLST) (48, 49), le CNRL, en collaboration avec Sylvain Brisse (Unité de Génomique Evolutive des Microbes, Institut Pasteur), a mis en place une base de données MLST hébergée par l'infrastructure informatique de l'Institut Pasteur. La base contient l'ensemble des allèles des gènes MLST et des profils alléliques définis avec cette méthode. Une partie de la base est dédiée à la collecte des informations sur les souches représentatives de chaque profil MLST présent dans la base. Cette base est ouverte et accessible en ligne à la communauté scientifique (<http://bigsd.b.pasteur.fr/listeria/listeria.html>). M. Maury (CNRL) et S. Brisse sont curateurs de cette base. Ce système partagé favorise les échanges et les collaborations internationales sur l'étude de la structure génétique des populations de *Listeria*.

Base de données cgMLST : la base de données et les outils nécessaires pour caractériser des souches par cgMLST à partir de séquences génomiques, ont été mis à la disposition de la communauté scientifique (<http://bigsdbs.pasteur.fr/listeria/listeria.html>). A la fin de l'année 2017, la base contenait 20 000 génomes publics ou privés de *Listeria*. Une consultation publique ou privée est possible. Un règlement définit le cadre des dépôts et des consultations pour la partie privée. Sauf réquisition écrite auprès du CNRL par les autorités compétentes ou avec l'accord écrit du tiers privé ou de l'organisme étranger concerné, les données privées ne sont pas communicables aux autorités.

Base de données et outil de comparaison PFGE/cgMST : Logiciel Bionumerics 7.6* (Applied Maths) : Le CNRL possède une base de données des profils de macrorestriction des souches réceptionnées au CNRL depuis 2005 qui comporte outre les 17 718 profils de macrorestriction et 7293 cgMLST, le numéro de la souche, son origine humaine-alimentaire-autre définie par une lettre, le numéro d'alerte produit associé, son pays de provenance, sa sensibilité aux antibiotiques, la date de prélèvement pour les souches humaines, le type de produits ou d'environnement pour les souches non humaines, des remarques techniques, les numéros de ces profils et les données de MLST. Grâce à cette base de données, le CNRL a informatisé la comparaison des cgMLST et lui permet d'attribuer avec fiabilité un numéro de nomenclature, type (CT) CgMLST, en conformité avec son cahier des charges. En 2017, le CNRL a continué de travailler sur la version 7.6. et son module automatique de définition des cgMLST *Listeria monocytogenes* que le CNRL, l'Institut Pasteur et Applied Maths ont développé ensemble afin de le mettre à disposition des autres laboratoires et l'utiliser en routine.

Les conditions de mise à disposition

L'accès aux données des bases relève des mêmes conditions que celles indiquées dans le chapitre précédent pour les souches de collections.

A.6. MANAGEMENT DE LA QUALITE ET HYGIENE/SECURITE AU SEIN DU CNRL

Le CNRL est accrédité depuis 2015 par le COFRAC selon la norme EN ISO 15189 (Attestation d'accréditation N°8-2588 disponible sur le site web du COFRAC) et fait partie du Laboratoire de Référence et d'Expertise Multisite (LRE-MS) de l'Institut Pasteur). Cette accréditation lui permet de répondre à l'ordonnance du 13 janvier 2010 et à la loi du 31 mai 2013 relative aux activités de biologie médicale. Son système de management de la qualité repose sur plus de 530 documents dématérialisés et rassemblés dans la base de gestion documentaire de l'Institut Pasteur (Webcampus). Ces documents sont revus au minimum tous les deux ans et appliqués par l'ensemble du CNRL. Ce système est conforme aux normes NF EN ISO 15189 et NF EN ISO 17025. Le correspondant qualité est A. Leclercq.

Liste des faits marquants survenus en 2017-2018 :

1. Evaluation de surveillance COFRAC LRE-MS en Janvier 2017 : 1 jour d'évaluation pour le CNRL en qualité/technique. Les conclusions de l'audit de surveillance de Janvier 2017 ont été positives, le rapport d'évaluation indique que les évaluateurs accordent leur confiance au LRE-MS
2. Revue qualité LRE-MS du CNR *Listeria* : Mars 2017
3. Revue de direction du LRE-MS : Mai 2017
4. Audits internes technique et qualité : Septembre-octobre 2017
5. Audit de surveillance et/ou d'extension COFRAC LRE-MS en Janvier 2018

Le géosérotypage a été sélectionné en 2014 pour l'accréditation, car c'est un outil qui permet d'assurer une traçabilité entre les ADN envoyés à la plateforme de séquençage PIBnet/P2M et la séquence.

En 2017, le CNR n'a pas réalisé d'enquête satisfaction client, mais cette enquête est prévue en 2018.

Dans le cadre de son accréditation, le CNRL a mis en place un système permettant d'effectuer des analyses en urgence et en mode dégradé, ce qui passe parfois par de la sous-traitance, avec accord des autorités compétentes.

Le calendrier des futures demandes d'accréditation de méthodes est présenté dans le tableau 9.

Tableau 9. Liste des méthodes soumises à l'accréditation et volume d'activité annuelle (%)

Méthodes analytiques	% Activité	Année prévue de soumission à l'accréditation
Identification de <i>Lm</i> par Maldi-Tof MS	50%	2019
Génosérotypage de <i>Listeria monocytogenes</i>	50%	2015

Essais d'intercomparaison (EQA)

En 2017, le CNRL a réalisé un essai d'intercomparaison dans le cadre de la validation de la méthode Maldi-Tof MS Bruker pour le genre *Listeria* et un autre essai d'intercomparaison organisé par l'ECDC sur le génosérotypage de *Lm*. Le but est de vérifier que les CNRs génèrent des résultats similaires à partir d'un même échantillon, condition essentielle pour que des échanges de données puissent avoir lieu. Pour les EQA depuis 2013, le CNRL a obtenu les résultats présentés dans le Tableau 10.

Tableau 10. Résultats du CNRL à l'EQA de l'EURL puis de l'ECDC de 2012 à 2017

Campagne EQA (Date)	EURL <i>Lm</i> (Avril 2012)	EQA N°1 ECDC (Mars 2013)	EQA N°2 ECDC (Octobre 2013)	EQA N°3 ECDC (Octobre 2014)	EQA N°4 ECDC (Octobre 2015)	EQA N°1 ISP (Décembre 2016)	EQA N°1 Bruker (Septembre 2017)	EQA N°5 ECDC (Octobre 2017)
Nombre de laboratoires participants	33	18	18	18	18	2	5	18
Nombre de souches testées	10	10	10	11	11	15	36	11
Identification <i>Lm</i> par phénotypie	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	ND	ND
Identification <i>Lm</i> par Maldi-Tof MS	ND	ND	ND	ND	ND	Conforme	Conforme	ND
Scores sérotypage classique	ND	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	ND	ND	ND
Scores sérotypage moléculaire	ND	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	ND	Conforme
Qualité Gel PFGE	Ascl	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	ND	ND
	Apal							
Analyse gel PFGE Bionumerics	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	ND	ND	ND

Hygiène/Sécurité

Le correspondant hygiène et sécurité du CNRL est P. Thouvenot.

ANNEXE B : ACTIVITES D'EXPERTISE DU CNR *LISTERIA*

B.1. METHODES DE REFERENCES ET MARQUEURS EPIDEMIOLOGIQUES DISPONIBLES

Le CNRL reçoit les souches de *Lm* isolées de patients par les biologistes médicaux [laboratoires publics hospitaliers et Laboratoires d'Analyses de Biologie Médicale (LABM) privés, ainsi que LABM plateformes de Microbiologie privés]. Il reçoit également des souches isolées d'aliments ou de l'environnement de production alimentaire qui sont envoyées au CNRL par les laboratoires d'hygiène et de contrôle des aliments publics agréés (LVD, LDA, SCL, Laboratoires privés, etc.). Ces souches d'origine alimentaire ou environnementale sont envoyées dans le cadre d'alertes appelées « alertes-produits » générées par la Direction Générale de l'Alimentation (DGAI), la Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes (DGCCRF) ou dans le cadre d'investigations autour de cas ou d'autocontrôles.

Les souches font systématiquement l'objet des analyses suivantes :

- **Vérification de la pureté** des souches réceptionnées sur gélose nutritive (Sous-processus de la méthode de l'étape Identification suivante à accréditer ISO 15189 en 2019). Si la souche envoyée est un mélange de souches, elle est isolée sur gélose sélective chromogène ALOA® (AES Laboratoire, France) et sur gélose au sang de cheval (bioMérieux, France).

- **Identification du genre et de l'espèce** par spectrométrie de masse Maldi-Tof (Bruker Daltonics, Allemagne) et recherche du caractère hémolytique, complétés par d'autres tests classiques si nécessaire (Méthode à accréditer ISO 15189 en 2019) (8, 50). Les tests biochimiques [galerie API-*Listeria*® (bioMérieux, France)] ne sont utilisés qu'exceptionnellement, en cas de panne du spectromètre de masse ou de résultats ambigus ou de détermination de la sous-espèce, ainsi que pour comparaison avec les résultats de laboratoires correspondants. Les souches atypiques ou identifiées comme non *Listeria* spp. sont identifiées par analyse du gène codant pour la sous-unité ribosomale 16S après amplification par PCR, puis par séquençage du génome.

- **Détermination du sérotype PCR** (Méthode accréditée ISO 15189) selon la méthode publiée par le CNRL en 2004 (51) et amendée en 2011 (20). Cette PCR multiplex cible une partie de la séquence du gène *prs* présent dans l'ensemble des espèces décrites de *Listeria* et quatre autres gènes (*Lmo1118*, *Lmo0737*, *ORF2110*, *ORF2819*) spécifiques de *Lm*, permettant de déterminer le sérotype PCR. Cette PCR multiplex peut être effectuée directement sur colonie sur gélose de la souche envoyée par le correspondant. Le sérotype PCR est également identifié *in silico* à partir de la séquence génomique. La comparaison du sérotype PCR déterminé *in silico* avec celui déterminé *in vitro* est utilisée comme contrôle interne pour confirmer la concordance entre la séquence génomique et l'isolat correspondant. Le CNR possède l'ensemble des sérums antifacteurs O et H commerciaux et de référence OMS pour réaliser sur demande (majoritairement hors-France) le sérotypage classique des souches de *Listeria* spp.

- **Antibiogramme** de toutes les souches d'origine humaine en utilisant la technique de dilution en milieu gélifié selon les recommandations de l'EUCAST. Ces antibiogrammes sont effectués sur un panel de 23 antibiotiques. La lecture de l'antibiogramme est réalisée sur un automate Scan 4000 (InterScience) paramétré pour le référentiel EUCAST. Les éventuelles résistances sont confirmées par la détermination de la CMI par E-test. Les mécanismes des résistances identifiées sont ensuite étudiés (31, 52).

- **Séquençage du génome**. Les ADNs génomiques sont extraits (méthode DNeasy Blood & Tissue extraction kit (Qiagen, Danemark)) et vérifiés en qualité par fluorimétrie. La préparation des bibliothèques est réalisée en utilisant le kit NEXTERA XT DNA Sample et les séquences génomiques sont déterminées sur la plateforme Illumina NextSeq 500 (Illumina, Californie, USA). L'assemblage est réalisé avec le logiciel SpAdes. Le cgMLST est extrait du génome assemblé par l'algorithme BLASTN implémenté sur la plateforme BIGSdb-*Lm* (<http://bigsdb.pasteur.fr/listeria/listeria.html>) puis transféré dans le logiciel bioNumerics version 7.6. pour réaliser les comparaisons et analyses. Cette méthode cgMLST est utilisée depuis le 1^{er} janvier 2017 en routine pour la surveillance, en remplacement de la PFGE. L'analyse des génomes permet également la caractérisation de gènes de virulence et de résistance aux antibiotiques et antiseptiques. Ainsi la détection de mutations conduisant à la

truncation dans le facteur de virulence InlA permet d'estimer le niveau de virulence de la souche concernée. En cas d'épidémie, de crise ou d'urgence, le CNRL peut augmenter son recours au séquençage grâce à l'utilisation d'autres équipements de l'Institut Pasteur.

D'autre part, en cas de nécessité, les analyses suivantes peuvent être effectuées :

- **Typage rapide de souches.** Sur la base du schéma MLVA que le CNRL a établi, les souches d'intérêt de *Lm* peuvent être typées et leur appartenance à un type MLVA déterminée rapidement. Il s'agit d'un outil de criblage rapide qui peut être utile en cas d'épidémies.

- **Typage MLST par PCR multiplexe.** L'appartenance à un clone MLST peut être déterminée rapidement par une méthode de PCR multiplexe (PCR de clonogrouping) développée et brevetée par le CNRL (24). Cette méthode permet de positionner rapidement les souches par rapport aux clones MLST majeurs et d'ainsi prédire le potentiel infectieux des souches (23).

- **Caractérisation de la virulence des souches de *Lm*** par inoculation par voie orale ou parentérale de gerbilles ou de souris humanisées et/ou par des tests *in vitro*.

- A la demande de l'ANSM, le CNRL réalise également des **analyses de détection de souches de *Lm* viables** par isolement sur gélose ALOA (bioMérieux) à partir d'échantillons de selles.

Le CNRL ne réalise pas :

- de sérologie, compte tenu de l'intérêt en pratique clinique non démontré de cette technique,

- de PCR ou qPCR sur LCR ou d'autres échantillons cliniques à visée diagnostic, qui sont effectuées en LABM. La qPCR *hly*, très spécifique peut constituer une aide diagnostique, notamment dans les formes neuroméningées. Les PCR syndromiques méningites peuvent présenter une sensibilité diminuée par rapport à la qPCR spécifique.

B.2. TECHNIQUES RECOMMANDEES PAR LE CNRL

En microbiologie clinique

Le CNRL recommande de suivre les recommandations de l'European Manual of Clinical Microbiology / REMIC européen, 5ème édition, 2015, chapitre *Listeria* (53) qui vient d'être révisé par le CNRL fin 2017.

Dans le cas de la réception d'un prélèvement en vue de la réalisation d'une PCR sur échantillons biologiques ou de sérologie, le CNRL transfère la demande au service accrédité COFRAC de Microbiologie de l'Hôpital Necker-Enfants malades pour les demandes de PCR sur LCR et aux laboratoires spécialisés (Pasteur Cerba ou Biomnis) pour les demandes de sérologie (Les tests sérologiques ne sont pas recommandés par le référentiel en Microbiologie (REMIC) 2015 (50).

- *Culture - Isolement - Incubation (24 h -37°C)*

Hémoculture : milieux commerciaux classiques

LCR : Bouillon nutritif glucosé à 0,5%

Selles : isolement directement sur gélose ALOA™ ou gélules équivalentes si selles de moins de 24h sinon isolement après congélation -20°C durant 2 semaines si selles de plus de 24h

Autres prélèvements : Gélose nutritive ordinaire ou à 5% de sang frais, supplémentée ou non en acide nalidixique et colistine (Gélose ANC).

- *Identification*

L'identification par MALDI-TOF est correcte pour les principales espèces isolées en France pour le système MALDI-TOF MS Bruker Daltonics équipé ou non du système subtyping développé spécifiquement pour *Listeria* et est correcte pour le genre pour le MALDI-TOF MS Vitek MS (bioMérieux) (8, 54).

Le CNRL recommande les galeries API *LISTERIA* (bioMérieux) qui ont un dossier complet de validation, à défaut API CORYNE (bioMérieux) ou la galerie MICROBACT 12L (Oxoid) ainsi que le Vitek 2 (bioMérieux). Les galeries API CORYNE doivent être complétées par des tests supplémentaires, car elles ne permettent que le diagnostic de genre *Listeria* et sont à l'origine de confusions notamment l'absence de distinction entre *L. grayi* avec *L. monocytogenes*.

- *Sérotypage*

Le CNRL ne recommande plus le sérotypage.

- *Antibiogramme*

Méthode de diffusion en gélose Mueller-Hinton supplémentée ou non avec 5% de sang et 20 mg/L de β -Nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) incubé en aérobie à 35+/-1°C pendant 18+/-2h.

Principaux antibiotiques à tester : pénicilline G, amoxicilline, gentamicine, tétracycline, érythromycine, chloramphénicol, triméthoprim-sulfaméthoxazole. À noter les problèmes d'interprétation de la sensibilité aux sulfamides et dérivés sur gélose MH supplémentée au sang.

Le CNRL recommande l'utilisation du protocole EUCAST v8.0 dont les protocoles et interprétations sont disponibles à l'adresse web : http://www.eucast.org/antimicrobial_susceptibility_testing/ qui est complété par les valeurs d'interprétation contenues dans le M45 (3rd edition, 2016) et le M100 (28th edition, 2018) du CLSI (55, 56). Les concentrations minimales inhibitrices et les diamètres sont en cours d'établissement.

A la demande de nombreux laboratoires correspondants, nous proposons le tableau 11 suivant d'interprétation des résultats d'antibiogrammes.

Tableau 11. Valeurs de référence pour l'interprétation des antibiogrammes pour *Listeria monocytogenes* (* selon le CLSI M45 (3rd edition, 2016) ainsi que le CLSI M100 (28th edition, 2018) et ** selon l'EU-CAST version 8.0 page 73 à http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/)

Antibiotiques	Critères MIC mg/L		
	Seuil de sensibilité	Valeurs intermédiaires	Seuil de résistance
Ampicilline**	≤ 1	-	> 1
Amoxicilline*	≤ 4	$> 4 - \leq 16$	≥ 16
Benzylpenicilline**	≤ 1	-	> 1
Gentamicine*	≤ 4	8	≥ 16
Ciprofloxacine*	≤ 1	2	≥ 4
Chloramphénicol*	≤ 8	16	≥ 32
Streptomycine*	≤ 8	$> 8 - \leq 16$	> 16
Méropénème**	≤ 0.25	-	> 0.25
Vancomycine*	≤ 4	8-16	≥ 32
Erythromycine**	≤ 1	-	> 1
Tétracycline*	≤ 4	8	≥ 16
Triméthoprim +Sulfaméthoxazole**	≤ 0.06 (exprimé pour la concentration en Triméthoprim)	-	> 0.06 (exprimé pour la concentration en Triméthoprim)

- *Sérodiagnostic*

Le CNRL ne peut effectuer de recommandations faute d'études prospectives sur de larges cohortes décrivant les performances des tests actuellement disponibles. Il existe des prestataires de ce service en France utilisant différents kits qui peuvent aboutir à des résultats divergents en absence d'assurance interlaboratoire de la qualité des résultats d'essais. Le sérodiagnostic décrit dans le REMIC (Sérodiagnostic de la listériose, chapitre 65) n'est pas pris en compte dans la surveillance nationale (53) et ne sont plus recommandés dans les dernières éditions du REMIC.

On peut citer comme méthodes pouvant être effectuées dans des laboratoires spécialisés :

- La méthode développée par le service de microbiologie à l'Hôpital Necker-Enfants Malades qui repose sur la réalisation d'un dot-blot pour détecter les anticorps totaux anti-lystériolysine O (LLO) grâce à des antigènes purifiés d'un fragment de la protéine, LLO-411 (57). Des titres de 1/100 à 1/5000 sont constatés dans l'infection aiguë. La positivité semble le plus souvent associée à une infection évolutive avec foyers profonds notamment dans les cas d'encéphalite et des infections évoluant depuis plusieurs jours, car la séroconversion semble tardive notamment dans le cas des infections materno-fœtales. Dans le cadre de patients septicémiques, ses performances semblent moindres. Compte tenu d'une possible réactivité aux dilutions faibles (à rapporter à de possibles immunisations antérieures asymptomatiques), il est indispensable de réaliser deux tests à 15 jours d'intervalle pour affirmer une séroconversion. La séroconversion affirme une infection invasive récente.
- La méthode de séroagglutination avec des anticorps contre des bactéries tuées : kit commercial Dade Berhing (Suspensions de *Listeria* O et H pour la réaction de Gruber-Widal). Des titres d'anticorps agglutinants de 1/320 à 1/640 au-delà de 10 jours d'infection sont constatés.
- La méthode DIATHEVA (Fano, Italie) qui est un ELISA commercial pour la détection des IgG anti-LLO dans le sérum humain et le plasma. Ce kit n'a pas encore été évalué d'après la littérature.

- *Méthodes de PCR*

Le CNRL ne peut formuler de recommandations, faute d'études prospectives sur de larges cohortes de patients décrivant les performances des tests de détection moléculaire de *Lm* disponibles. Il semble néanmoins pour les PCR sur LCR qu'une qPCR spécifique *Lm* (gène *hly*) soit plus sensible qu'une PCR 16S ADNr (Données préliminaires du projet Monalisa). Ainsi, les résultats de la PCR ne sont pas pris en compte à ce jour dans la surveillance nationale.

La cellule interministérielle *Listeria* a missionné le CNR en 2017 pour questionner les LABM français sur les kits ou méthodes utilisées pour le diagnostic de *Lm* sur LCR ou autres fluides biologiques afin de reconnaître ces dernières méthodes pour la définition des cas. Le réseau de biologistes français R2M a été contacté et les réponses suivantes ont été données :

- La méthode de détection qualitative par qPCR de l'ADN de *Lm* en échantillons cliniques la plus utilisée et sous accréditation est le kit RealCycler LIST-U/LIST-G (Orgentec SASU, Trappes) ;
- La méthode de PCR syndromique sur LCR avec le kit Filmarray Méningites/Encéphalites (bioMérieux, Marcy l'Etoile) (58, 59) et
- pour les PCR syndromiques sur sang avec le kit Filmarray Blood Culture Identification (BCID, bioMérieux, Marcy l'Etoile).

Pour les PCR syndromiques, les résultats doivent être toujours confrontés aux données clinico-biologiques du patient.

En microbiologie vétérinaire

Le CNRL recommande de suivre les instructions de l'Office International des Epizooties téléchargeables à l'adresse : http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.09.07_LISTERIA_MONO.pdf

En microbiologie des aliments

Conformément au règlement européen EC 2073/2005 modifié, le CNRL recommande en France de suivre la norme de référence pour les prélèvements de l'environnement NF ISO 18593 : Microbiologie des aliments - Méthodes horizontales pour les techniques de prélèvement sur des surfaces, au moyen de boîtes de contact et d'écouvillons, et les normes de référence pour la détection et l'énumération de *Listeria* spp. et *Listeria monocytogenes*:

- NF EN ISO 11290-1: Microbiologie des aliments - Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de *Listeria monocytogenes* et de *Listeria* spp. - Partie 1 : méthode de recherche ;
- NF EN ISO 11290-2: Microbiologie des aliments - Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de *Listeria monocytogenes* et de *Listeria* spp. - Partie 2 : méthode de dénombrement

Les méthodes alternatives validées selon l'EN ISO 16140-2 par AFNOR certification et par Microval sont actualisées et disponibles sur les sites respectifs : <https://nf-validation.afnor.org/domaine-agroalimentaire/>

Concernant les méthodes commerciales d'identification des *Listeria*, le CNRL recommande l'utilisation de la galerie API *LISTERIA* (bioMérieux) ainsi que le Vitek 2 (bioMérieux) (60) et comme alternative la galerie MICROBACT 12L (Oxoid), il recommande à ses laboratoires correspondants ou interlocuteurs de se conformer aux recommandations émanant du Laboratoire National de Référence des *Listeria monocytogenes* situé à l'ANSES-LSA (Maisons-Alfort). Le système MALDI-TOF MS Bruker Daltonics avec la méthode MALDI Biotyper peut être également utilisé avec de préférence une extraction totale des protéines ou par un dépôt direct pour une identification des principales espèces de *Listeria* isolées en France (Méthode validée en 2018 Association of Official Agricultural Chemists (AOAC) International : OMA#2017.10. First Action).