

Rapport Annuel d'Activité

2019

**Centre National de Référence
*Listeria***

**Année d'exercice
2018**

RESPONSABLE :	Marc LECUIT
RESPONSABLE ADJOINT :	Alexandre LECLERCQ
INGENIEUR :	Mylène MAURY
MEDECIN CHERCHEUR :	Caroline CHARLIER-WOERTHER
TECHNICIENS :	Hélène BRACQ-DIEYE Pierre THOUVENOT Guillaume VALES Nathalie TESSAUD-RITA
ASSISTANTE :	Andrée DIAKITÉ

AVANT-PROPOS

Le Centre National de Référence *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 2018.

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. 2019. Rapport annuel d'activité du Centre national de Référence des Listeria – Année 2018. Institut Pasteur, Paris, France) dont elles sont issues.

RESUME

En 2018, le Centre National de Référence *Listeria* (CNRL) a séquencé 2150 souches de *Listeria* dans le cadre de ses missions de surveillance, dont 393 souches humaines (correspondant à 332 cas humains), 1183 souches d'alertes produits, 366 souches d'autocontrôles, ainsi que 208 souches séquencées dans le cadre d'investigations de clusters passés et d'étude de la biodiversité. 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 l'accréditation COFRAC NF EN ISO 15189 (Attestation d'accréditation N°8-2588).

En 2018, le CNRL note une augmentation des échanges d'informations 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, en réponse aux messages d'alertes émis par les états membres de l'Union Européenne. Le CNRL/CC-OMS *Listeria* a ainsi participé à l'investigation de 11 alertes européennes dont une mondiale sur des végétaux surgelés dont la surveillance française a permis d'identifier la source. Il a également participé, en lien avec l'OMS et Santé Publique France (SPF), à l'investigation d'une épidémie de listériose en Afrique du Sud (plus grande épidémie mondiale à ce jour).

Le CNRL participe à la détection des cas groupés et à l'identification de sources de contamination, en lien avec SPF et les autres partenaires de la cellule *Listeria*. La méthode de typage moléculaire des souches est le cgMLST (core genome MultiLocus Sequence Typing), méthode de typage de référence pour la surveillance microbiologique de *Lm* en France. En 2018, 94 clusters ont été investigués, dont la source a été identifiée pour 20 (21% des clusters, contre 6% en 2017 et environ 10% lorsque la PFGE était utilisée).

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 aussi l'étude de la biodiversité et l'évolution de *L. monocytogenes*.

Le CNRL a finalisé en 2018 une étude sur l'ensemble de ces souches alimentaires et environnementales. Cette étude a permis de montrer que l'adaptation à l'intestin des mammifères des clones hypovirulents de *Listeria monocytogenes* participe à leur association avec les produits laitiers (Maury et al., 2019, Nat. Commun.). Le CNRL a finalisé une étude rétrospective sur les infections pleuro-pulmonaires (Morgand et al., Clin Microbiol Inf, 2018 (2)) et un projet collaboratif avec la Faculté vétérinaire de Bern (Suisse) sur la comparaison entre la listériose humaine et animale listeriosis (Grant Sinergia Study of Fonds National Suisse de la Recherche Scientifique). Ceci a permis l'analyse radiologique des neurolistérioses, qui a été publiée en 2018 (Charlier et al., Clin Infect Dis, 2018 (1)).

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 atypiques de *L. innocua* hémolytiques (Moura et al., Infect Immun, 2019 (3)) et à la description de la nouvelle espèce *Listeria thailandensis* (Leclercq et al., IJSEM, 2019 (15)).

SUMMARY

In 2018, the National Reference Centre *Listeria* (CNRL) has sequenced 2150 strains of *Listeria* in the framework of its surveillance activities, comprising 393 human strains (corresponding to 332 human cases), 1183 strains of food alerts, 366 strains of own-check controls and 208 strains sequenced in investigations of ancient clusters and *Listeria monocytogenes* biodiversity. The NRCL has characterized and typed all the strains as a part of the microbiological surveillance of listeriosis (Annex A). These activities were done in line with its accreditation COFRAC according to the standard NF EN ISO 15189 (Accreditation Certificate N°8-2558).

In 2018, the NRCL noted an increase of information exchanges with European listeriosis surveillance structures through the EPIS platform EPIS (Epidemic Intelligence Information System) of ECDC during European health alerts. The NRCL/WHO-CC *Listeria* contributed to the investigation of 11 Urgent Inquiries (European Alerts) including a global one on frozen vegetables which French surveillance has allowed to identify the food source, and together with WHO and Santé Publique France (SPF) to help investigate an outbreak of listeriosis in South Africa (the world largest so far).

The NRCL participates in the detection of human clusters and identification of contamination sources, with SPF and other members of the *Listeria* cell, based on the cgMLST (core genome MultiLocus Sequence Typing) typing, the reference method for *Listeria* surveillance in France. In 2018, 94 clusters were investigated, with a source identified for 20 (21% of clusters, compared to 6% in 2017 and around 10% when the PFGE method was used).

Molecular characterization by cgMLST of clinical, food and environmental strains allows the detection of emerging clones of epidemiological and microbiological interest, and also helps better understand the molecular basis of *Lm* virulence. It also allows the study of *Lm* biodiversity and evolution.

The NRCL has finalized a study of environmental and alimentary strains. It evidenced that the adaptation of hypovirulent *Lm* clones to mammal gut accounts for their association with dairy products (Maury et al., 2019, Nat. Commun.). The NRCL also finalized a retrospective study on pleuro-pulmonary infections (Morgand et al., Clin Microbiol Inf, 2018 (2)) and 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). The neuroradiological analysis of neurolisteriosis has been published in 2018 (Charlier et al., 2018, Clin Infect Dis (1)).

In connection with Biology of Infection Unit, to which it is affiliated, the NRCL participates to projects which aim at 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 understanding the pathophysiology of listeriosis. These works resulted this year in the publication of a study on atypical haemolytic *L. innocua* strains (Moura et al., Infect Immun, 2019 (3)) and the description of the new species: *Listeria thailandensis* (Leclercq et al., IJSEM, 2019 (15)).

TABLE DES MATIERES

1. MISSIONS ET ORGANISATION DU CNR.....	8
1.1. ORGANISATION ET EVOLUTIONS INTERVENUES EN 2018.....	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.....	11
2.3. TECHNIQUES TRANSFEREES VERS D'AUTRES LABORATOIRES.....	11
2.4. COLLECTION DE MATERIEL BIOLOGIQUE.....	11
2.5. ACTIVITES D'EXPERTISE 2018.....	11
2.6. ACTIVITES DE SEQUENÇAGE.....	14
3. ACTIVITES DE SURVEILLANCE MICROBIOLOGIQUE DE LA LISTERIOSE EN FRANCE.....	15
3.1. DESCRIPTION DU RESEAU DE PARTENAIRES LABM.....	15
3.2. SURVEILLANCE DE L'EVOLUTION ET DES CARACTERISTIQUES DES INFECTIONS.....	15
3.3. CARACTERISATION DES SOUCHES D'ORIGINE NON HUMAINE REÇUES AU CNRL.....	27
3.4. SURVEILLANCE DE LA RESISTANCE AUX ANTI-INFECTIEUX.....	32
3.5. INTERFACE AVEC LES RESEAUX DE SURVEILLANCE NATIONAUX OU INTERNATIONAUX.....	34
3.6. ENQUETE OU ETUDES PONCTUELLES CONCOURANT A LA SURVEILLANCE.....	40
4. ENQUETES OU ETUDES PONCTUELLES CONCOURANT A LA SURVEILLANCE ET ALERTE.....	42
4.1. SUSPICIONS D'INFECTIONS NOSOCOMIALES.....	42
4.2. CLUSTERS CGMLST ET EPIDEMIES.....	42
4.3. TOXI-INFECTIONS ALIMENTAIRES COLLECTIVES.....	43
4.4. ALERTES-PRODUITS DGAL.....	43
4.5. ALERTES PRODUITS DGCCRF.....	46
4.6. ENQUETES DES FORMES NEUROMENINGEES (ENQUETES « FRIGO »).....	46
4.7. «URGENT INQUIRIES» DE L'ECDC.....	46
4.8. ENQUETE JUDICIAIRE.....	47
5. ACTIVITES DE RETRO-INFORMATION, DE FORMATION ET DE CONSEIL.....	49
5.1. CONSEIL ET EXPERTISE AUX PROFESSIONNELS DE SANTE.....	49
5.2. CONSEIL ET EXPERTISE AUX AUTORITES SANITAIRES.....	52
5.3. CONSEIL ET EXPERTISE POUR D'AUTRES CIBLES (MEDIAS, GRAND PUBLIC, ETC.).....	52
6. TRAVAUX DE RECHERCHE ET PUBLICATIONS EN LIEN DIRECT AVEC L'ACTIVITE DU CNRL.....	54
6.1. ACTIVITES DE RECHERCHE EN COURS EN 2018.....	54
6.2. LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS DE 2018.....	58
7. COOPERATION AVEC LES LABORATOIRES DE SANTE ANIMALE, D'HYGIENE ALIMENTAIRE, ENVIRONNEMENTAUX.....	61
7.1. COOPERATION.....	61
7.2. ECHANGES ENTRE LE CNR ET LE LNR.....	62
8. PROGRAMME D'ACTIVITE POUR LES ANNEES 2019-2020.....	63
9. REFERENCES.....	64
ANNEXE A : ORGANISATION DU CNR.....	68
A.1. MISSIONS DU CNR.....	68
A.2. PERSONNEL PERMANENT.....	69
A.2. LOCAUX.....	70

A.3. EQUIPEMENT.....	71
A.4. MAINTIEN, DETENTION ET DIFFUSION DE MATERIEL BIOLOGIQUE	72
A.5. MAINTIEN ET DETENTION DES BASES DE DONNEES DU CNRL.....	74
A.6. MANAGEMENT DE LA QUALITE ET HYGIENE/SECURITE AU SEIN DU CNRL.....	76
A.7. REGLEMENT GENERAL SUR LA PROTECTION DES DONNEES (RGPD).....	78
ANNEXE B : ACTIVITES D'EXPERTISE DU CNR <i>LISTERIA</i>.....	79
B.1. METHODES DE REFERENCES ET MARQUEURS EPIDEMIOLOGIQUES DISPONIBLES.....	79
B.2. TECHNIQUES RECOMMANDEES PAR LE CNRL.....	80

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
Ila	Sérovars 1/2a et 3a de <i>Lm</i>
Ilb	Sérovars 1/2b, 3b et 7 de <i>Lm</i>
Ilc	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)
MS	Spectrométrie de Masse
N	Système nerveux central
NICD	National Institute for Communicable Diseases (South Africa)
PCR	Réaction de polymérisation en chaine
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
UI	Urgent Inquiry (Alerte Européenne ECDC dans EPIS)

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 *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 522 biologistes français (recensement 2017-2018), ainsi que les laboratoires vétérinaires départementaux, la DGCCRF et les laboratoires privés d'hygiène des aliments (environ 212 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 2018

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.

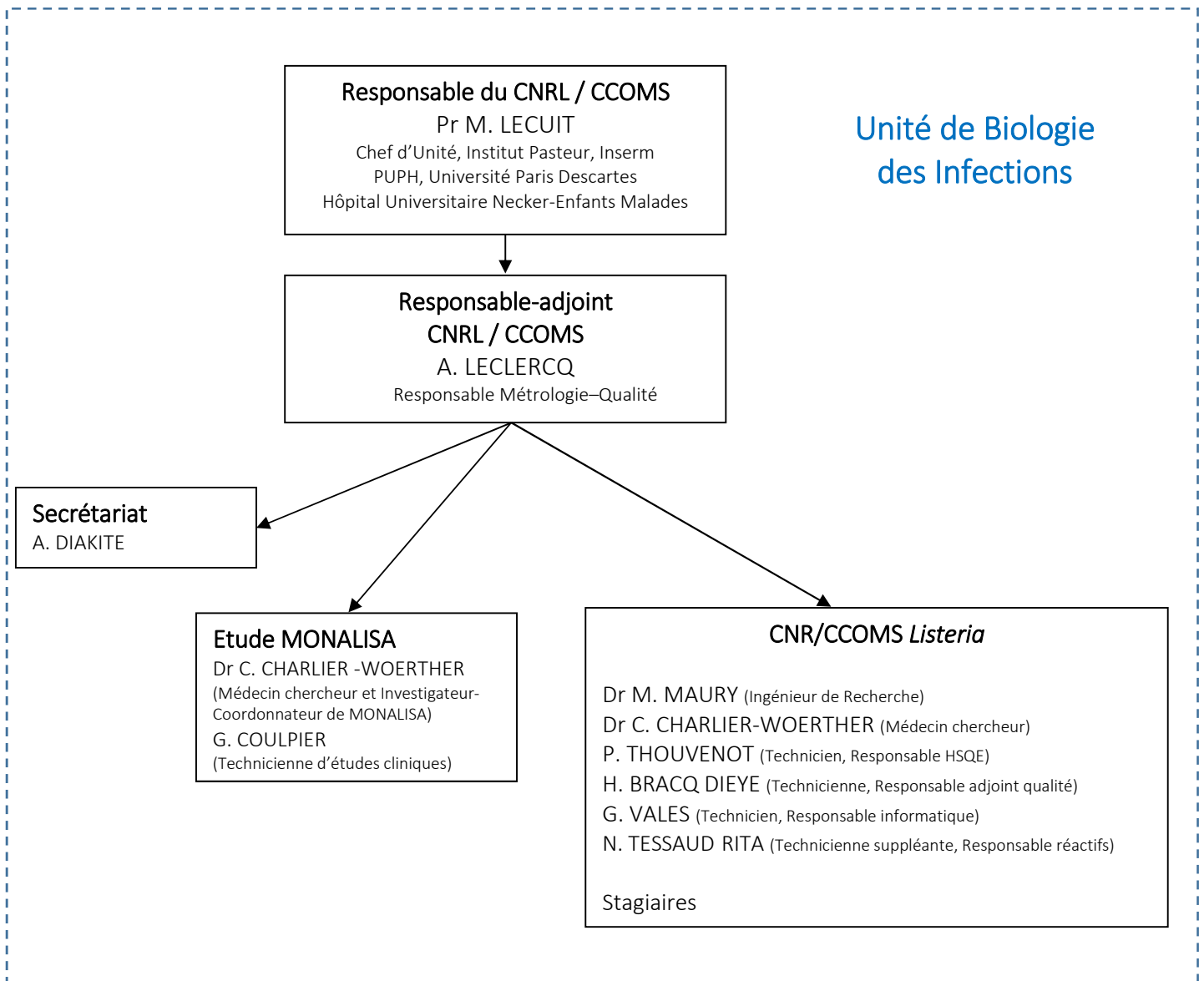
Depuis le 01 Janvier 2017, le cgMLST (core genome MultiLocus Sequence Typing) est la méthode de typage de référence pour la surveillance microbiologique de *Lm* en France.

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. Il sera de nouveau évalué en Avril 2019. Cette accréditation représente maintenant 100% de son activité à accréditer pour 2020 (Annexe B).

Figure 1. Organigramme du CNR des *Listeria* au 01/04/2019



2. ACTIVITES D'EXPERTISE

ELEMENTS CLES DE 2018

- Participation à la validation internationale de l'identification des *Listeria* par la méthode de spectrométrie de masse (MS) MALDI-TOF (Bruker Diagnostics)
- Surveillance des performances des PCR syndromiques
- Collection de 1942 nouvelles souches caractérisées de *Listeria*
- Délai de récupération des souches humaines en réduction : 6 jours
- Délai médian stable 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

Le CNRL avait précédemment validé de la méthode MALDI-TOF MS BIOTYPER BRUKER Daltonics pour l'identification des espèces du genre *Listeria* (8). Il avait précédemment participé à la validation de la méthode MALDI-TOF MS ANDROMAS pour l'identification du genre *Listeria* (9).

En 2017, 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'améliorer l'identification des espèces. Ceci a donné lieu à une publication suivante dans laquelle le CNRL a été remercié pour sa contribution :

Article: Bastin B, Bird P, Crowley E, Benzinger MJ, Agin J, Goins D, Sohler D, Timke M, Awad M, Kostrzewa M. Confirmation and Identification of Listeria monocytogenes, Listeria spp. and Other Gram-Positive Organisms by the Bruker MALDI Biotyper Method: Collaborative Study, First Action 2017.10. J AOAC Int. 2018 Sep 1; 101(5):1610-1622.

Abstract: The Bruker MALDI Biotyper® method utilizes matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) MS for the rapid and accurate confirmation and identification of Gram-positive bacteria from select media types. This alternative method was evaluated using nonselective and selective agar plates to identify and confirm *Listeria monocytogenes*, *Listeria* species, and select Gram-positive bacteria. Results obtained by the Bruker MALDI Biotyper were compared with the traditional biochemical methods as prescribed in the appropriate reference method standards. Sixteen collaborators from 16 different laboratories located within the European Union participated in the collaborative study. A total of 36 blind-coded isolates were evaluated by each collaborator. In each set of 36 organisms, there were 16 *L. monocytogenes* strains, 12 non-monocytogenes *Listeria* species strains, and 8 additional Gram-positive exclusivity strains. After testing was completed, the total percentage of correct identifications (to both genus and species level) and confirmation from each agar type for each strain was determined at a percentage of 99.9% to the genus level and 98.8% to the species level. The results indicated that the alternative method produced equivalent results when compared with the confirmatory procedures specified by each reference method.

De même, le CNRL est en contact avec la firme Bruker pour lui indiquer les nouvelles espèces de *Listeria* qui pourraient être ajoutées à leur module d'identification et valider leur détection.

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

PCR syndromiques

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) (10-14).

2.3. TECHNIQUES TRANSFEREES VERS D'AUTRES LABORATOIRES

En 2018, le CNRL (M. Maury) a transféré la méthode de typage cgMLST et a formé le Dr Anthony Smith du NICD (Johannesburg, Afrique du Sud) pour l'analyse de génomes de *Lm* dans le cadre des investigations d'une épidémie de grande ampleur survenue dans ce pays.

2.4. COLLECTION DE MATERIEL BIOLOGIQUE

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

- celle des souches de référence qui a été complétée en 2018 avec l'espèce *L. thailandensis* (15);
- celle des souches de son activité de CNR *Listeria* qui a été complétée en 2018 de 1942 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 2019, l'inventaire de ces collections aujourd'hui effectué sous Excel sera migré vers le logiciel BRCLims.

2.5. ACTIVITES D'EXPERTISE 2018

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 2018, le CNRL a reçu également 59 (2017 :323) souches isolées de patients ou d'aliments adressées par 5 laboratoires étrangers (Afrique du Sud, Belgique, Danemark, Espagne, Pologne) ou de produits importés pour expertise, dans le cadre de ses activités de Centre Collaborateur de l'OMS. Le CNRL a également reçu 366 souches d'origine environnementale et/ou alimentaire (261 en 2017 ; 262 en 2016) adressées par des laboratoires d'hygiène et de contrôle des aliments pour identification et caractérisation (autocontrôles, prestations payantes), mais intégrées à la surveillance nationale, en respectant la confidentialité des données sur les souches qui sont mises à la disposition des autorités compétentes qui en feraient la demande officielle au CNRL.

Tableau 1. Souches réceptionnées au CNRL en 2018 et analyses effectuées

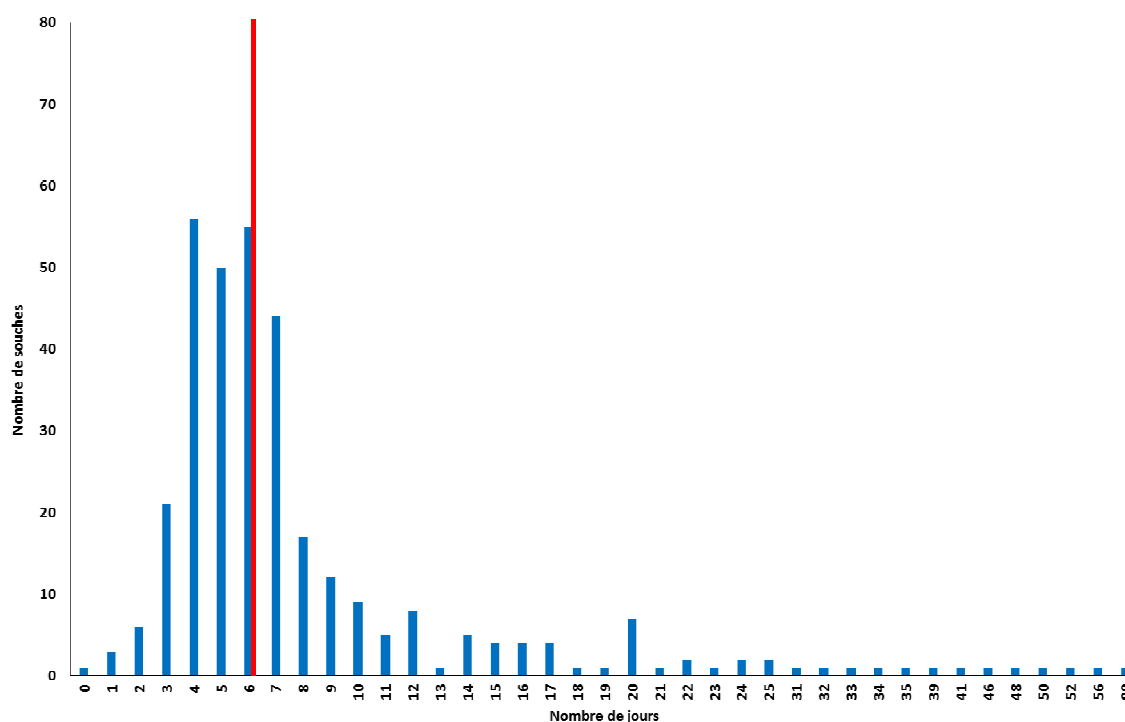
Nombre de souches	Origine	Pourcentage de fiches de données réceptionnées	Provenance	Pays	Identification	PCR séro groupe	Antibiogramme	Séquençage et cgMLST
311	Humaines	100%	Centres Hospitaliers	France	100%	100%	100%	100%
82	Humaines	100%	Laboratoires Privés	France	100%	100%	100%	100%
1183	Alimentaires et environnementales (Alertes)	100%	Laboratoires de Microbiologie alimentaire	France	100%	100%	0%	100%
366	Alimentaires et Environnementales (Autocontrôles, intégrés à la surveillance nationale)	100%	Laboratoires de Microbiologie alimentaire	France	100%	100%	0%	100%

208	Humaines, Alimentaires et Environnementale (Investigation historique de clusters)	100%	CNRL	France	100%	100%	0%	100%
TOTAL 2150	-	100%	-	-	100%	100%	100% des souches humaines	100%

Délai identification / réception

Le **délai médian entre le prélèvement et la réception** des souches au CNRL est de 6 jours (Figure 2) (2017 : 8 jours). Les délais extrêmes s'expliquent par le temps écoulé 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 2018 (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 2017-2018, le CNRL a publié ou a participé à la publication d'évaluations de l'identification de l'espèce et du genre *Listeria* par MALDI-TOF (8, 16). 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.

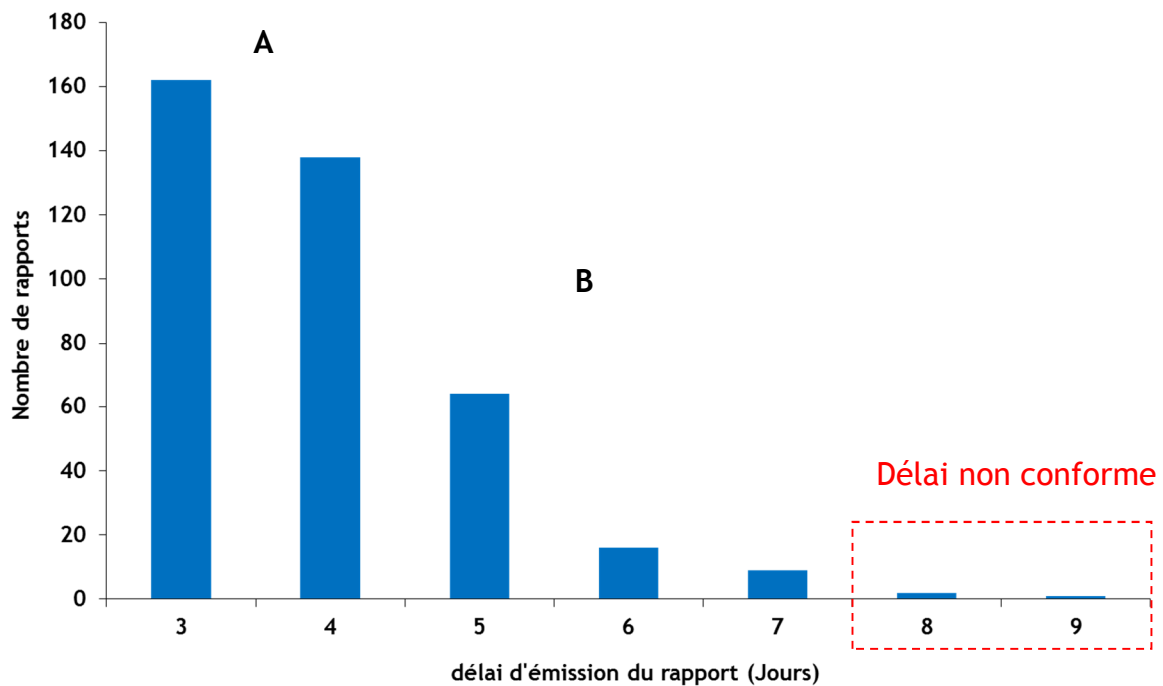
Parmi les souches qui nous ont été adressées en 2018, la détermination de l'espèce quel que soit leur origine était correcte dans 99,5% des cas (vérifiée par séquençage). 99.7% des souches humaines furent bien identifiées comme *L. monocytogenes*. Les identifications erronées correspondaient à des souches n'appartenant pas au genre *Listeria*.

Envoi du rapport d'essai

Le **délai médian 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 2018 (4j en 2017) (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.

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 2018 (A, rapports d'analyses sans week-end ; B, rapports d'analyses avec week-end et jours fériés)



2.6. ACTIVITES DE SEQUENÇAGE

En 2018, le CNRL a séquençé 2150 souches de *Listeria* dans le cadre de son activité continue de surveillance (n=1942) et d'études des investigations, clusters et épidémies (n=208) 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 (17), deux fois par semaine (Mercredi/Vendredi), selon la technologie illumina. Les banques sont préparées avec le kit Nextera XT et séquençées 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 l'une des deux personnes du CNRL en charge de la surveillance A. Leclercq, et M. Maury en son absence, déterminent le type cgMLST de ces souches sur 1748 loci (18). 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 pour la surveillance nationale a été développé par un chercheur post-doctoral de l'Unité de Biologie des Infections, en collaboration avec Sylvain Brisse (18). 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 2018

- Taux d'exhaustivité de réception des souches humaines de 98% et des souches d'alertes produits de 62%
- Nombre de cas de listériose en diminution
- Age médian des cas en augmentation passant à 78 ans
- 21% des clusters dont la source alimentaire a été identifiée par cgMLST contre 10% par la méthode PFGE
- Structure de la population des souches de *Listeria monocytogenes* françaises stable par rapport à 2017
- Principale cause des rappels produits alimentaires en 2018 (24%)
- Assistance à la gestion de l'épidémie de listériose en Afrique du Sud en collaboration avec SPF

3.1. DESCRIPTION DU RESEAU DE PARTENAIRES LABM

Les laboratoires expéditeurs des souches cliniques (n=393) sont à 79% (87% en 2017) hospitaliers, reflétant la sévérité de l'infection. Les autres structures sont des laboratoires privés 21% (13% en 2017). 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 (appelé cluster, 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 2018 avec une souche reçue et caractérisée par le CNRL. Ceci inclut également des souches reçues au CNRL au cours du premier trimestre 2019 pour des cas déclarés en 2018, compte tenu des délais d'acheminement des souches après la déclaration.

Proposition de modification en Europe

En Juin 2018, la Commission Européenne SANTE C3 a publié 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 pour définir un cas confirmé en Europe de listériose (https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=uriserv%3AOJ.L_.2018.170.01.0001.01.ENG).

En 2020, un outil de notification au CNRL des PCR *Listeria* positive sans isolement de souches sera mis en place dans le cadre du déploiement de son nouveau LIMS AGILAB de gestion analytique du CNRL.

3.2.2. Analyse globale des cas de listériose

Nombre total de cas

En 2018, le CNRL a reçu 359 souches humaines (397 en 2017) liées à 342 suspicions d'infections humaines déclarées à SPF (372 en 2017). La différence observée entre nombres de souches et de cas est liée à l'existence de doublons voire triplicats de souches (n=34) par patient, et donc non pris en compte dans l'analyse finale.

Un cas a eu un second épisode de listériose à *L. monocytogenes* avec un isolement de *Lm* d'un écoulement du genou en 2018, après un premier épisode d'infection sur sa prothèse du genou en 2017 avec des souches de même caractéristique microbiologique (3 allèles de différence en cgMLST).

Un autre cas a été déclassé par l'ARS et concernait un patient asymptomatique, alimenté par nutrition entérale sur sonde gastrique qui a présenté un isolement de *L. monocytogenes* dans une expectoration (CLIP 2018/01951). En accord avec SPF, le CNRL n'a donc pas retenu ce cas pour 2018.

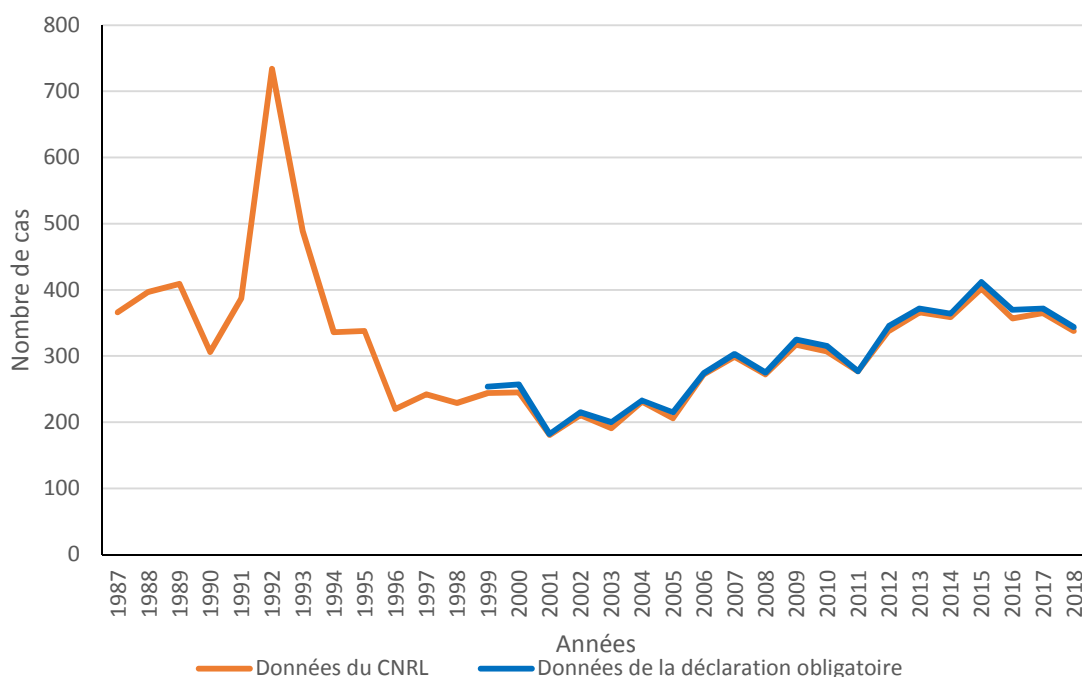
Pour 2018, le CNRL retient donc, après recoupement des données de SPF, 332 cas de listériose à *Listeria monocytogenes* (365 en 2016, soit une baisse de 9%) au jour du traitement statistique de ce rapport. La différence de 10 cas par rapport aux données de SPF est due à : 6 cas sans souche associée à la DO (car non conservées par les laboratoires); 1 cas diagnostiqué par culture, mais dont la souche envoyée au CNRL n'était pas cultivable ; 1 cas importé de Thaïlande (sans souche associée) et rapatrié en France ; 2 cas de Nouvelle-Calédonie (non comptabilisés par SPF). En 2018, il y a donc eu 326 cas en France métropolitaine et 6 dans les DROM-TOM-COM (dont 2 cas en Nouvelle-Calédonie).

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) (19).

L'incidence de la listériose humaine est de 5 cas par million d'habitants en 2018 (2017 : 5,4 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 par le CNRL et par la Déclaration Obligatoire (Source : SPF) entre 1987 et 2018



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 stable à 98% (en 2018 et en 2017) (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, grâce à la participation active des biologistes de France.

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% (20).

Cas de listériose dans les DROM-TOM-COM

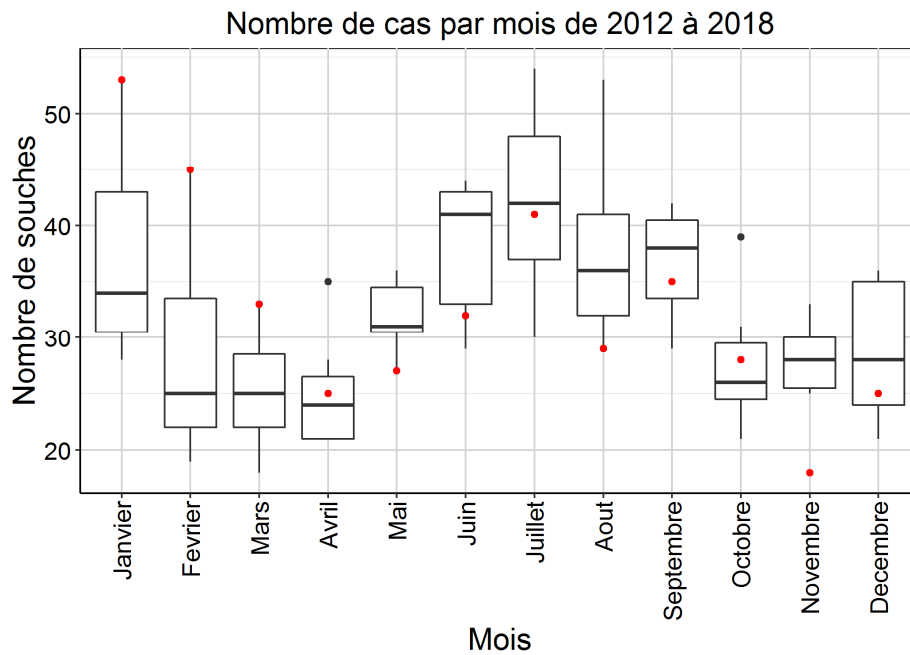
En 2018, 6 cas sporadiques de listériose (2017 : 11 cas) ont été identifiés dans les DROM-TOM-COM : 2 dans l'île de la Réunion, DROM le plus peuplé (1 forme materno-néonatale et 1 forme neuroméningée), 2 cas en Nouvelle Calédonie (2 formes materno-néonatales) et 1 cas en Guadeloupe (1 forme neuroméningée).

Distribution temporelle des cas métropolitains

Le nombre mensuel de cas sporadiques observés de 2012 à 2018 est présenté dans la Figure 5.

En 2018, les mois où le plus grand nombre des cas ont été notifiés sont Janvier et Juillet (Figure 5), reflétant 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 2018 (Le point rouge indique le nombre de cas pour 2018).



Distribution géographique

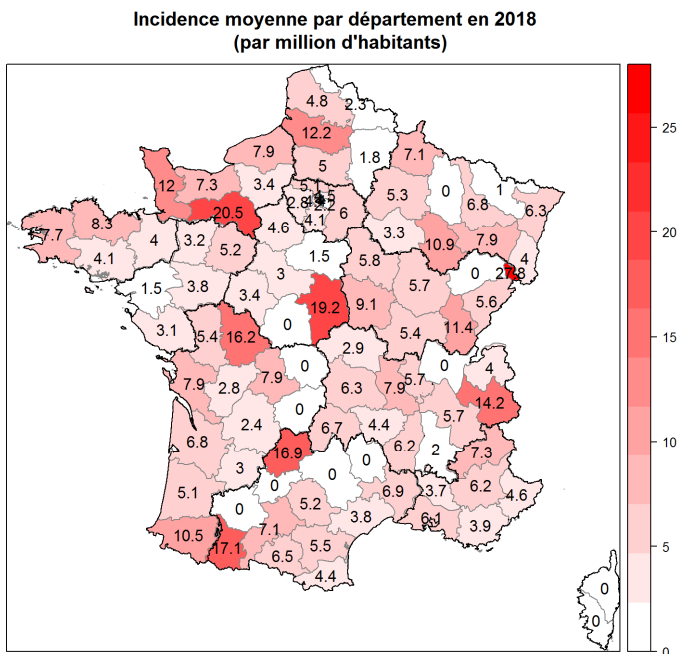
La distribution géographique des cas par département est présentée dans la Figure 6.

Les chiffres d'incidence sont exprimés en nombres de cas par 10⁶ d'habitants par département et ont été calculés à partir des données démographiques établies par l'INSEE.

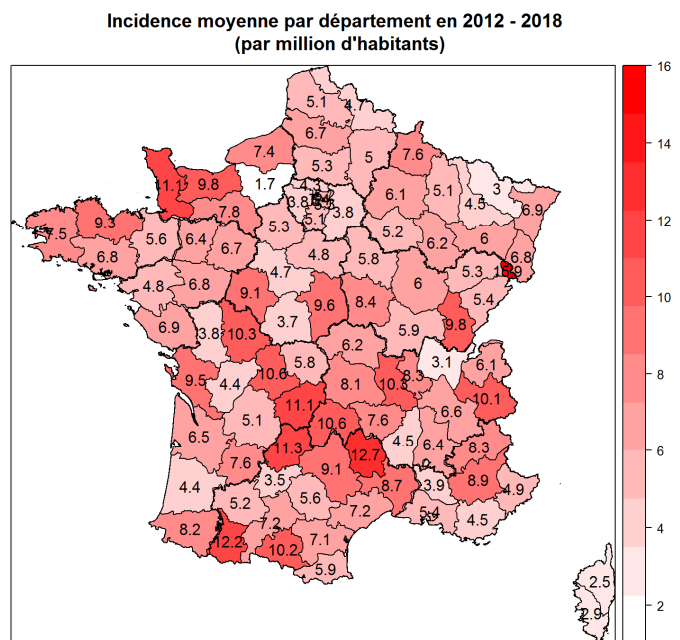
En 2018, l'incidence de la listériose était la plus élevée dans les départements de l'Orne, le Cher, les Hautes-Pyrénées, le Lot, la Vienne et la Savoie (Figure 6A). Sur les années 2012-2018, il existe une incidence légèrement plus élevée pour la moitié Sud de la France (Figure 6B).

Figure 6. Incidences départementales des cas de listériose en 2018 (A) et de 2012 à 2018 (B) (Incidence par 10^6 d'habitants par département).

A



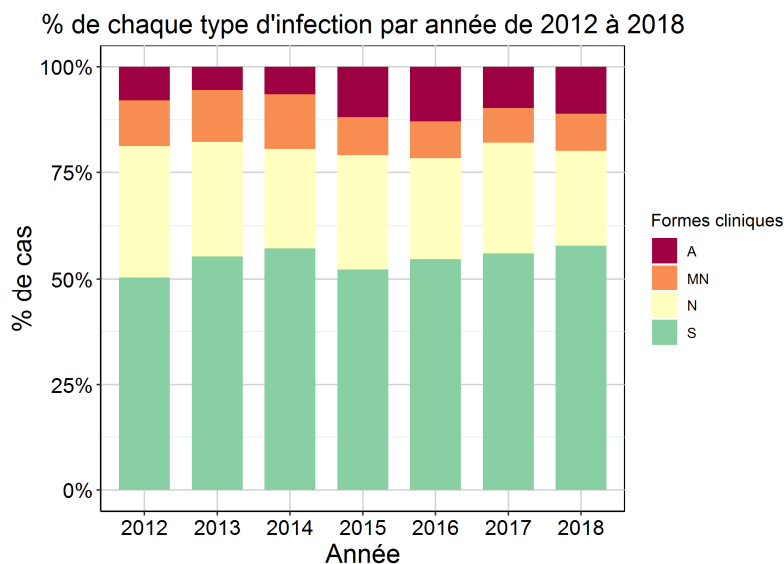
B



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

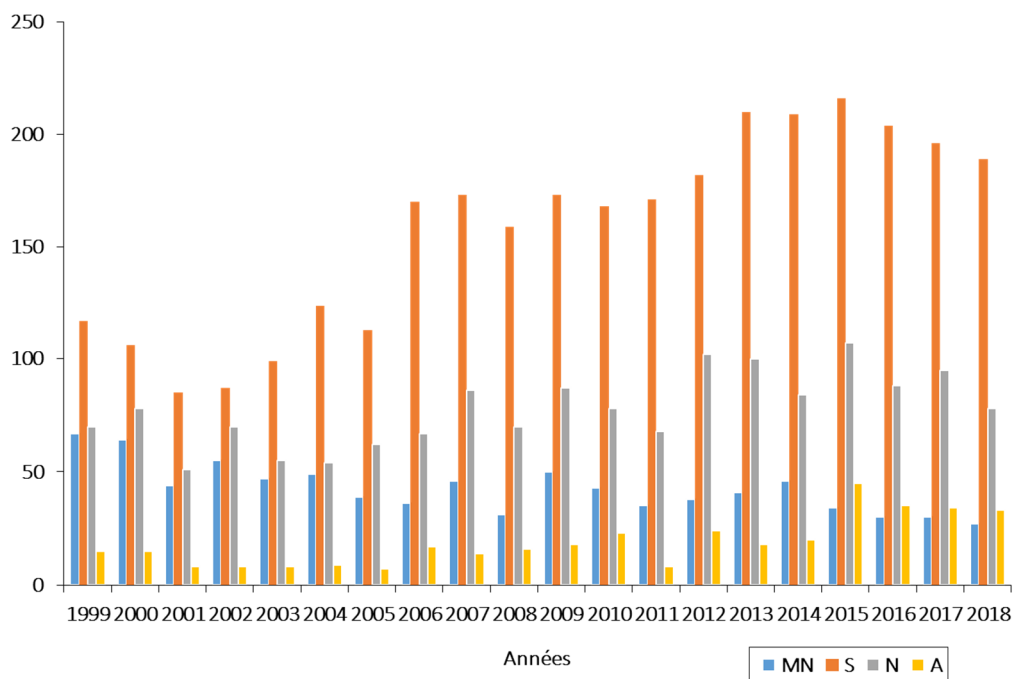
En 2018, 27 formes MN ont été enregistrées (2017 : 30), représentant 8,2% du nombre total de cas (2017 : 8,5%). En 2017, l'incidence des formes MN était de 3,6 pour 100.000 naissances vivantes (2017 : 3,9), l'une des plus faibles enregistrées depuis 2006. Le nombre de cas MN a diminué de 51% entre 1999 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) (4). Les raisons n'en sont pas connues [Situation socio-économique défavorisée, comme en Grande-Bretagne (21) ? et/ou consommation accrue d'aliments à risque, comme chez les femmes enceintes d'origine Mexicaine aux USA (22) ?]. **Ceci pourrait justifier des actions ciblées vers ces populations pour améliorer encore la prévention de la listériose.**

Formes non materno-néonatales

En 2018, 299 formes non materno-néonatales ont été enregistrées (323 en 2017), soit 91 % du total des cas sporadiques comme depuis 2016. Elles se répartissent en 189 formes septicémiques, 78 formes neurologiques et 32 autres formes. La Figure 8 indique leur répartition.

Figure 8. Évolution 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 2018. Une forme atypique a été rapportée sur un phlegmon du majeur droit et une autre sur une fistule chronique prosthétique.

Les infections ostéo-articulaires, biliaires, urinaires, oculaires et pleuro-pulmonaires ont fait l'objet d'analyses spécifiques dont les résultats ont été publiés (2, 5, 6, 23, 24). Des travaux sont en cours concernant les infections endovasculaires (article soumis), ganglionnaires, cutanées et les infections de liquides d'ascite.

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 2018, un chiffre stable depuis 2015. Dans 52% des cas renseignés en 2018, une ou plusieurs pathologies sous-jacentes étaient rapportées : cancer, cirrhose, éthylisme, diabète, dialyse, infection par le VIH, transplantation d'organe ou traitement immunosuppresseur (25) (50-56% de 2011 à 2017). Les comorbidités des patients avec listériose ont été analysées en détail dans le cadre de l'étude MONALISA (4).

Tableau 2. Répartition des autres formes de listériose de 2006 à 2018

Autres formes	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	Total
Vasculaire	1	4	0	1	0	2	1	1	1	2	3	4	1	21
Adénopathie	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	5
Endocardite	2	0	0	1	0	0	0	1	2	2	3	0	3	14
Os/articulaire	4	3	8	7	4	2	5	6	8	18	12	4	9	90
Digestive	0	1	0	0	1	1	3	1	1	3	1	0	4	16
Foie	1	0	2	2	1	0	0	0	0	2	1	1	1	11
Œdème	1	1	2	2	6	0	0	0	0	0	0	0	0	12
Erysipèle	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Infection d'ascite	5	3	6	3	10	3	12	7	4	9	8	15	6	91
Infection urinaire	0	0	0	1	1	0	2	0	0	0	1	0	1	6
Pneumopathie	0	0	1	1	2	1	3	1	3	3	3	2	2	22
Prostatite	1	0	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	1	5
Infection cutanée	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2	2	2	9
Abcès	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	3
Fièvre/Céphalées	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	3
Lymphome	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
Total	16	12	19	19	26	9	27	18	20	45	36	32	32	311

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

L'âge moyen des patients avec forme non-MN est de 70 ans en 2017 (2017 : 69 ans), avec une médiane de 78 ans (0 à 104 ans ; versus 76 ans en 2017 et 62 ans en 1999). Cette tendance pourrait refléter l'allongement de la durée de vie observée dans la population française (<https://www.insee.fr/fr/statistiques/1892088?sommaire=1912926>), mais aussi l'administration de traitements immunosuppresseurs à des patients de plus en plus âgés (Figure 9).

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

En 2017, parmi les sujets de plus de 60 ans, on notait également une répartition bimodale des cas : patients âgés d'environ 65 ans et d'environ 75 ans, qui n'est pas observée en 2018. 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 immunosuppresseives (2).

Figure 9. Données cliniques associées aux souches réceptionnées de 2012 à 2018 (formes cliniques et l'âge du patient). En rouge, les cas de 2018.

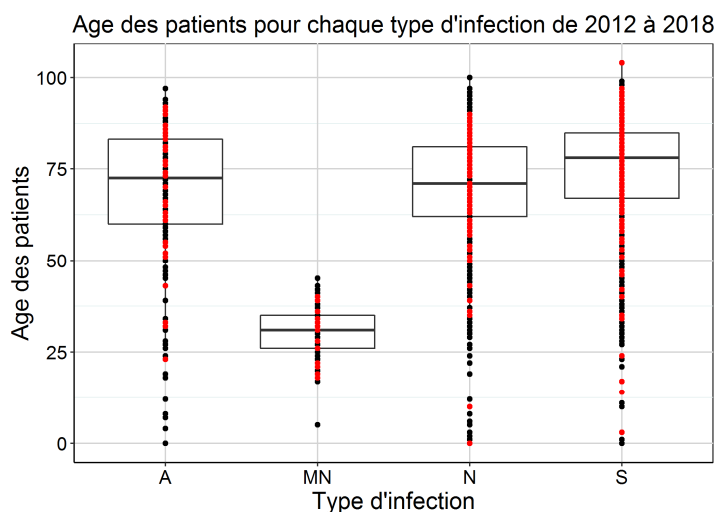
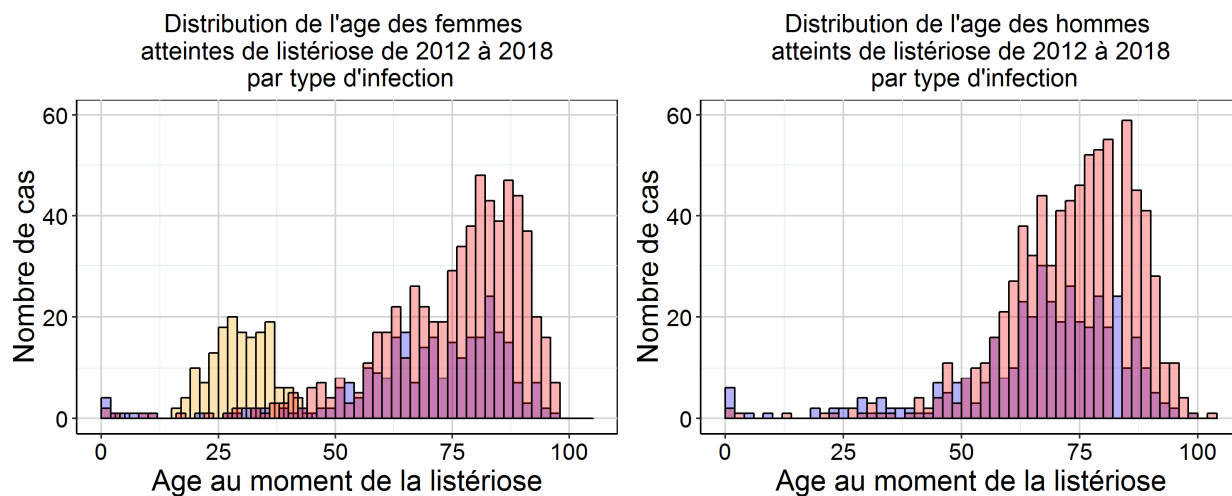
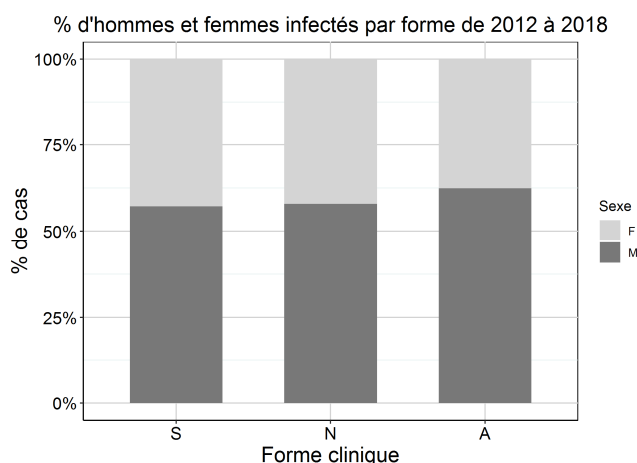


Figure 10. Distribution de l'âge des patients atteints de listériose entre 2012 et 2018 selon le sexe et le type d'infection. En jaune, les formes materno-néonatales. En rouge, les septicémies. En bleu, les formes neuroméningées. En violet, la superposition entre les formes septicémiques et des formes neuroméningées.



La distribution par sexe montre un excès significatif d'hommes par rapport au sex-ratio attendu dans cette classe d'âge (Figure 11). Le sex-ratio M/F était ainsi de 1,2 en 2018 comme depuis 2016 (avec 55 % d'hommes (2011-2017 : 59%). Cette prédominance masculine des formes non-MN est constatée dans d'autres pays occidentaux (22, 26), et reste inexplicée (différences d'exposition alimentaire ? prédisposition génétique liée au sexe ? Plus grand nombre de comorbidités immunosuppressives ?).

Figure 11. Répartition du sexe selon les formes cliniques S, N et A de 2012 à 2018



3.2.4. Analyse microbiologique

Analyse par groupe PCR

Analyse générale

Les distributions par groupe PCR et par année des souches d'origine humaine isolées de 2006 à 2018 en France métropolitaine sont présentées dans le Tableau 3 et Figure 12.

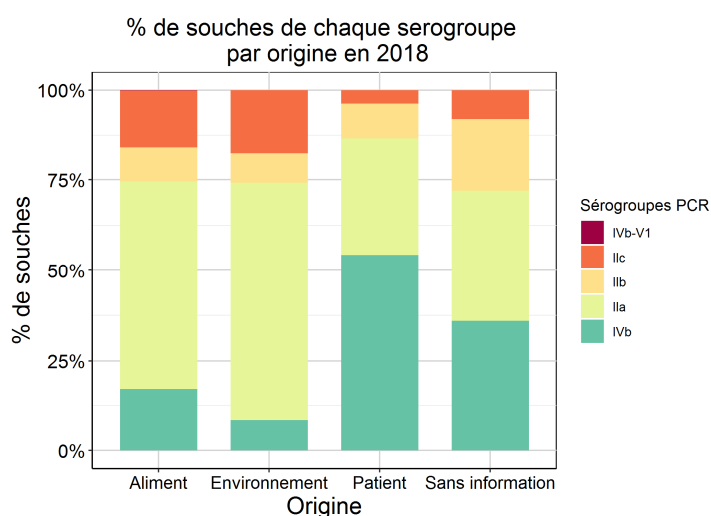
Le groupe PCR majoritaire des souches humaines isolées était le groupe PCR IVb comme en 2017. Il représente 54% des souches, suivi du groupe PCR IIa (32%), IIb (10%), puis IIc (4%) et L (<1%). Depuis 2006, cette distribution est stable, et diffère de celle observée pour les souches alimentaires, pour lesquelles le groupe PCR IIa est majoritaire (55%) (Figure 12).

Aucune souche d'origine humaine appartenant au variant v1 du Groupe PCR IVb a été identifiée en France en 2018. Cependant des souches de ce variant IVb-v1 (27) ont été identifiées dans des aliments en 2018 mais ne sont pas liées phylogénétiquement (17, 18).

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	2018
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%)	104 (32%)
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%)	32 (10%)
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%)	12 (4%)
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%)	177 (54%)
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 (0%)	1 (<1%)
Total		271	303	268	319	298	277	338	363	359	402	357	353	326

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

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 54% des cas au total (2017 : 47%), et dans 60% des cas MN et 58% 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. La grande majorité des souches IIc expriment une internaline (InIA) tronquée (28-30). 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 2018

	Materno-néonatale	Septicémie	Infections du système nerveux central	Autres formes	Total
IIa	5	64	25	10	104 (32%)
IIb	4	19	7	2	32 (10%)
IIc	0	10	1	1	12 (4%)
IVb (+ IVbv1)	18	95	45	19	177 (54%)
L	0	1	0	0	1 (<1%)
Total	27	189	78	32	326

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 (30). Elle est déterminée par cgMLST depuis l'utilisation de cette technique.

Aspect général

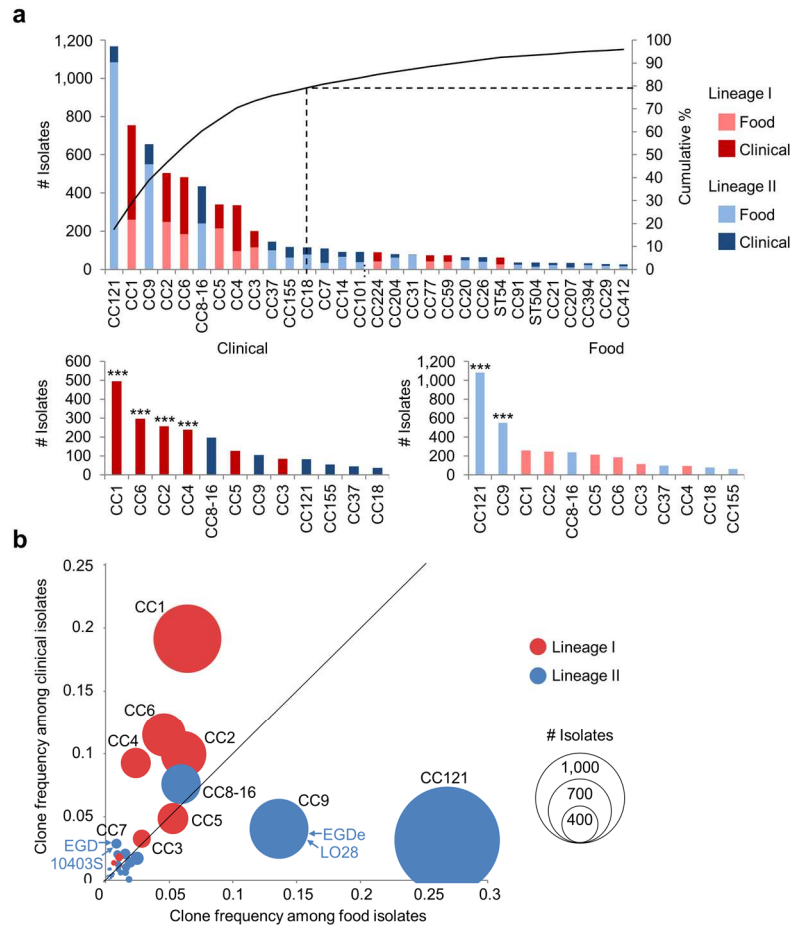
La prévalence et la distribution des clones MLST dans les échantillons cliniques et alimentaires ont été étudiées sur 6633 isolats collectés de manière exhaustive par le CNRL entre 2005 et 2013 (30).

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 (30).

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 (31). 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.

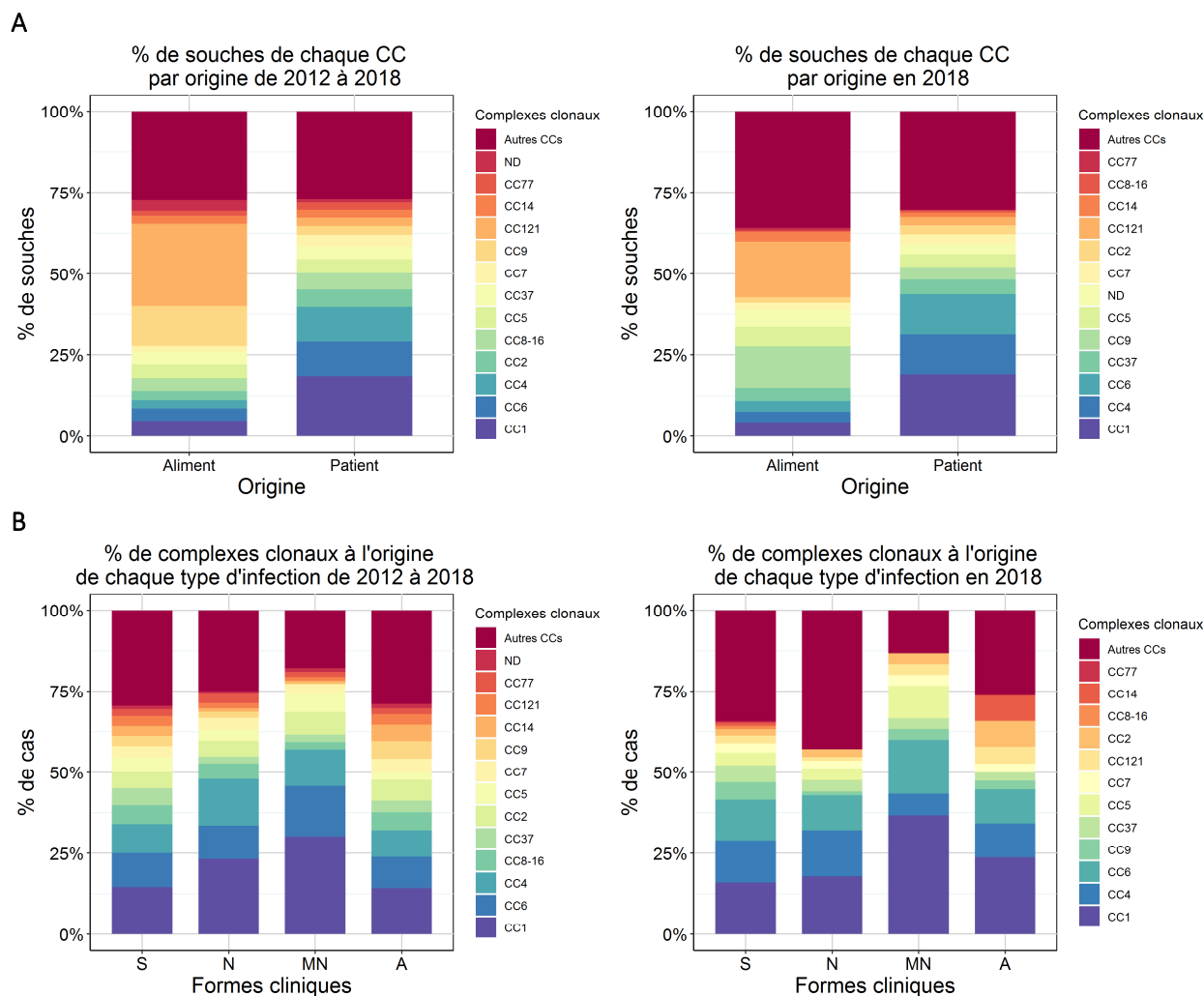
Le CNRL détermine le ST (MLST) ou CC (MLST) de ces souches par une extraction *in silico* de la séquence génomique de ces données au moyen du logiciel BIGSdb décrit en annexe B de ce rapport.

Figure 13. Prévalence et distribution des clones MLST de *Lm* dans les sources clinique et alimentaire d'isolement (Source : 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.



La Figure 14 montre la distribution, par formes cliniques, des différents clones des isolats cliniques collectés de 2012 à 2018. 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 (30).

Figure 14. Distribution des clones MLST par origines et types d'infection pour les isolats collectés de 2012 à 2018. (A) Distribution par origines. (B) Distribution par types d'infection. Les clones les plus fréquents sont représentés.



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. Le CNRL 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.

Aucune souche d'origine animale (vétérinaire) n'a été transmise au CNRL en 2018, l'étude de ces souches serait intéressant afin de mieux comprendre les chaînes de transmission de cette bactérie.

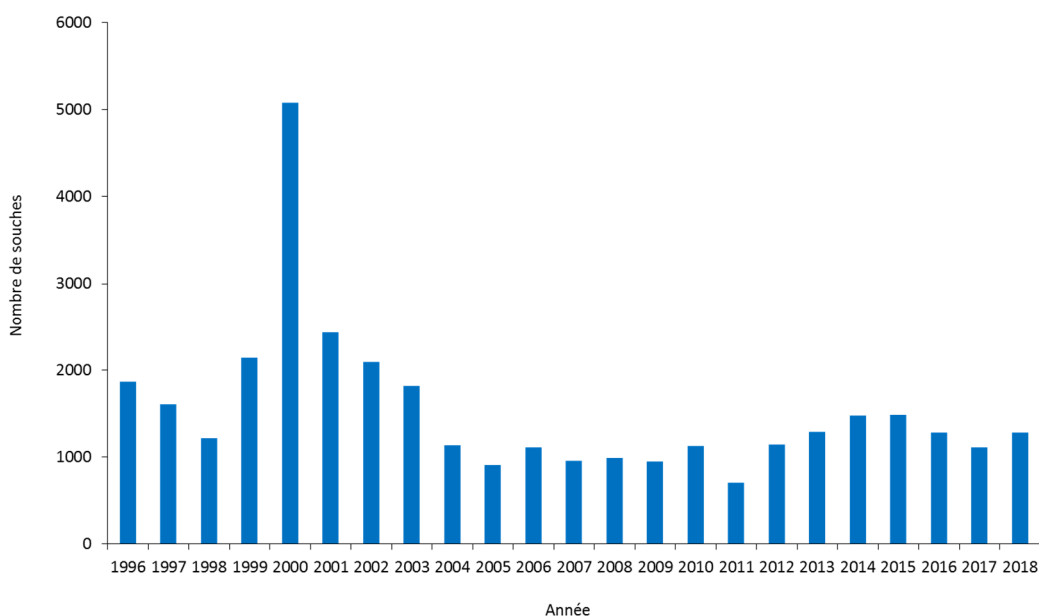
Analyse générale

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 2018, 1581 souches de cette catégorie ont été reçues de France métropolitaine (augmentation de 42% par rapport à 2017 (n = 1112)) (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 1581 souches non humaines reçues au CNRL en 2018, 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) : 281 souches (18%) [2017 : 169]
- Laboratoires privés d'hygiène alimentaire : 1276 souches (81%) [2017 : 903]
- Laboratoires Interrégionaux de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes : 8 souches (<1%) [2017 : 25]
- Laboratoires ANSES hors LNRI : 10 souches (<1%) [2017 : 8]
- Laboratoires d'Hygiène de Centres Hospitaliers : 1 souches (<1%) [2017 : 7]
- Laboratoires de recherche : 5 souches (<1%) [2017 : 0]

- L'origine des souches

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

- Souches isolées d'aliments : 1203 souches (76%) [2017 : 891]
- Souches isolées de l'environnement agroalimentaire : 370 souches (23%) [2017 : 205]
- Souches de recherche/sans information : 0 souches (0%) [2017 : 14]
- Souches isolées chez l'animal : 8 souches (<1%) [2017 : 2]

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

- Remarques

95% des souches reçues en 2018 appartenait à l'espèce *Lm* (97% en 2017), qui est la seule espèce mentionnée dans les réglementations de sécurité sanitaire des aliments et de l'environnement agroalimentaire. Certains laboratoires, à la demande de leurs clients, envoient pour confirmation des souches d'autres espèces de *Listeria* dans le cadre de la surveillance de *Listeria* spp. dans l'environnement des ateliers de production et de leur plan de maîtrise sanitaire (32).

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 30%, 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 1203 souches isolées d'aliments reçues au CNRL de 2018 pour les différentes catégories de laboratoires expéditeurs était la suivante :

- Laboratoires Vétérinaires Départementaux (LVD) : 210 (18%) [2017 : 161]
- Laboratoires privés d'hygiène alimentaire : 985 (82%) [2017 : 690]
- Laboratoires Interrégionaux de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes : 7 (<1%) [2017 : 25]
- Laboratoires ANSES dont LNRI : 0 (0%) [2017 : 6]
- Laboratoires d'hygiène de Centres Hospitaliers : 1 (<1%) [2017 : 7]

En 2018, le nombre de souches isolées d'aliments reçues au CNRL a augmenté de 26% par rapport à 2017. Parmi elles, aucune souche ne provenait d'un échantillon prélevé dans le cadre d'un plan de surveillance ou de contrôle géré par la DGAI et le LNRI mais confié par la DGAI au CNRL pour intégration dans la surveillance nationale et aucune souche n'a été envoyée par le LNRI dans le cadre d'investigation de clusters (envoyées au CNRL par le LNRI).

- Nombre de souches et distribution par espèce

Sur un total de 1203 souches d'origine alimentaire reçues au CNRL en 2018, 1174 (98%) ont été identifiées comme appartenant à l'espèce *Lm* (98% en 2017). Toutes les souches reçues ont été analysées.

En 2018, 6 souches n'appartenaient pas au genre *Lm*; il s'agissait d'*Enterococcus faecalis* et de *Bacillus* spp., dont les colonies ont un aspect évocateur de *Listeria* spp. sur milieu Agar selon Ottaviani et Agosti (33).

Le CNRL avait détecté de nombreuses souches contaminées avec *E. faecalis* sur les milieux ALOA/ALO-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 1197 souches de *Listeria* d'origine alimentaire reçues en 2018 était la suivante :

- *L. monocytogenes* : 1174 souches (98%) [2017 : 869]
- *L. innocua* : 8 souches (<1%) [2017 : 11]
- *L. welshimeri* : 14 souches (1%) [2017 : 2]
- *L. seeligeri* : 0 souche (0%) [2017 : 1]
- *L. ivanovii* subsp. *ivanovii* : 0 souche (0%) [2017 : 1]
- *L. ivanovii* subsp. *londoniensis* : 0 souche (0%) [2017 : 1]
- *L. grayi* : 1 souche (<1%) [2017 : 0]

L'identification des espèces est confirmée par l'analyse ANIb (Average Nucleotide Identification) des souches à partir des séquences génomiques et confirmé par le logiciel JSpeciesWGS (<http://jspecies.ribohost.com/jspeciesws/#home>).

↳ En 2017, la publication des deux normes analytiques NF EN ISO 11290 pour la recherche et le dénombrement des *Lm* et *Listeria* spp. n'a pas abouti à l'augmentation du nombre d'identifications de souches non *Lm* en 2018 pour les souches d'aliments par rapport à ce qui est observé pour celles d'environnements agro-alimentaires.

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

La répartition par catégories d'aliments des 1174 souches de *Lm* d'origine alimentaire reçues au CNRL en 2018 était la suivante :

- Viande et produits carnés : 497 souches (42%) [2017 : 324]
- Lait et produits laitiers : 371 souches (32%) [2017 : 342]
- Produits de la pêche : 142 souches (12%) [2017 : 133]
- Végétaux : 64 souches (5%) [2017 : 43]
- Autres aliments : 54 souches (5%) [2017 : 19]
- Sans information (confidentiel) : 46 souches (4%) [2017 : 8]

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 la désinfection 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 (34). **Le CNRL identifie de manière continue, par le biais de l'analyse du génome après séquençage, 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 IVb et IIc.

Comme l'illustrent la Figure 16 et le Tableau 5, le groupe PCR IVb (sérovars 4b, 4d et 4e) ne représente que 19% des souches alimentaires analysées en 2018 (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 (28, 29, 35-37), ce que nous avons démontré expérimentalement (28, 29, 35-37).** 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 (28, 29, 37). Dans un modèle murin humanisé d'infection, les souches du groupe IVb apparaissent également plus virulentes (30).

Figure 16. Distribution par groupes PCR des souches de *Lm* cliniques et alimentaires en 2018 et entre 2006 et 2018

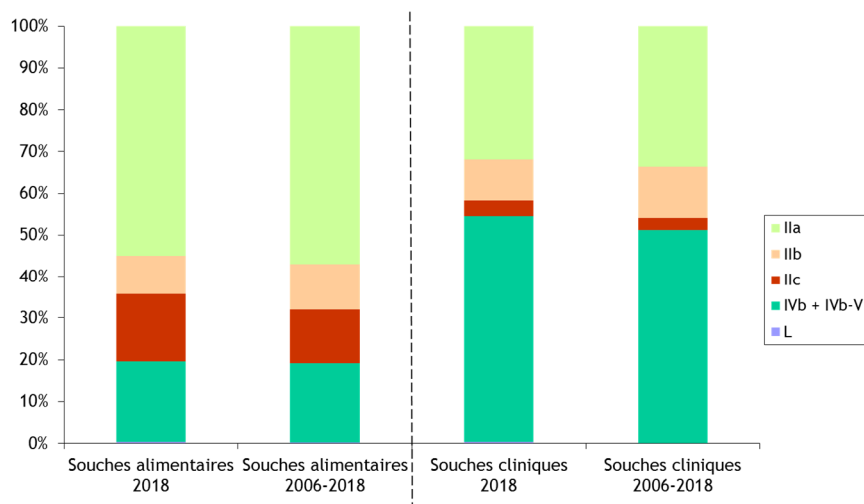


Tableau 5. Distribution par groupes PCR et par catégories d'aliments des souches alimentaires de *Lm* reçues au CNRL en 2018

Groupe PCR	viande et produits carnés	lait et produits laitiers	produits de la pêche	végétaux	autres aliments	origine non précisée	Total	Souches humaines
IIa	246	160	118	36	48	38	646 (55%)	104 (32%)
IIb	39	33	13	17	1	5	108 (9%)	32 (10%)
IIc	180	2	2	3	3	0	190 (16%)	12 (4%)
IVb	30	173	8	8	2	3	224 (19%)	177 (54%)
IVb-V1	0	2	0	0	0	0	2 (<1%)	0 (0%)
L	2	1	1	0	0	0	4 (<1%)	1 (<1%)
Total	497	371	142	64	54	46	1174	326

- 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 (30). A l'inverse, les clones CC1, 2, 4 et 6 sont beaucoup plus fréquemment identifiés en pathologie humaine que dans l'alimentation, et sont hypervirulents (30).

En 2018, les CCs les plus fréquents dans les aliments étaient, par ordre décroissant, CC121, CC101-90, CC9, CC1 et CC31. De 2012 à 2018, CC121, CC5, CC9, CC8-16 et CC1 étaient les plus représentés.

Souches isolées de l'environnement de production alimentaire industrielle

En 2018, 207 souches (2017 : 207 souches, soit +44%) provenant de l'environnement de production alimentaire ont été reçues au CNRL, adressées par des laboratoires vétérinaires départementaux (n=71, 2017 : 8), des laboratoires privés (n=289, 2017 : 197) ou l'ANSES (LNR, LCSSV) (n=10, 2017 : 2). 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 (révisée en 2018) 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%20opr%C3%A9%C3%A8vement_V3_20-08-2012.pdf).

Ces souches étaient assignées à l'espèce *L. monocytogenes* (n = 304), *L. innocua* (n = 33), *L. seeligeri* (n=22), *L. welshimeri* (n = 7), 2 souches non-*Listeria* (*Enterococcus faecalis*) et 2 tubes soient non ensemencés ou cassés.

La répartition par groupe PCR des 304 souches de *Lm* environnementales isolées en 2018 est la suivante :

- groupe PCR IIa (sérovars 1/2a et 3a): 205 souches (67%) (2017 : 148)
- groupe PCR IIb (sérovars 1/2b, 3b et 7): 30 souches (11%) (2017 : 6)
- groupe PCR IIc (sérovars 1/2c et 3c): 40 souches (13%) (2017 : 5)
- groupe PCR IVb (sérovars 4b, 4d et 4e): 25 souches (8%) (2017 : 35)
- groupe PCR L (autres sérovars): 4 souches (1%) (2017 : 2)

Les souches des groupes PCR IIa, IIc, et IIb sont majoritaires et représentent 90 % des souches.

En 2018, les CCs les plus fréquents dans l'environnement de production alimentaire étaient, par ordre décroissant, CC9, CC121, CC155, ST36 et CC204. De 2012 à 2018, CC121, CC9, CC5, CC8-16, CC1 et CC7 étaient les plus représentés. Les CCs hypovirulents et de virulence intermédiaire (30) sont donc prédominants dans cet environnement de production alimentaire.

Ces données restent peu représentatives des souches de l'environnement en général à cause du faible échantillonnage des souches hors production alimentaire. 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

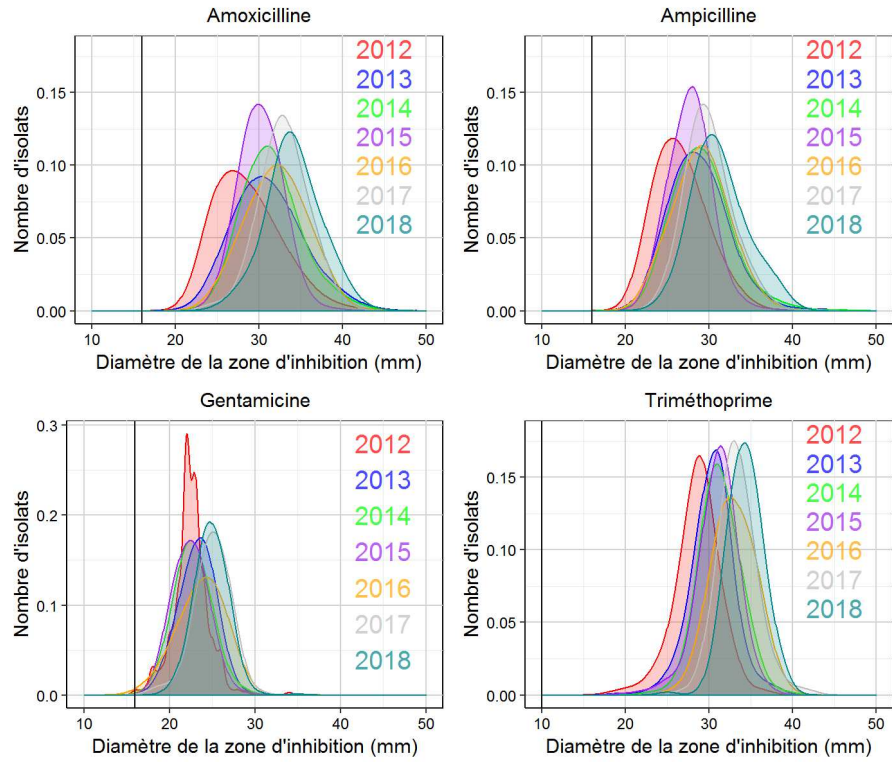
Toutes les souches d'origine clinique identifiées présentent une résistance naturelle *in vitro* aux céphalosporines de 3^{ème} génération dont le cefotaxime, à la clindamycine, à la fosfomycine, aux sulfonamides et à l'acide nalidixique. Depuis 2001, toutes les souches humaines reçues au CNRL étaient 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 (38).

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, 3 souches résistantes à la tétracycline ont été identifiées en 2018 (résistance contact) contre 4 souches en 2017, avec détection moléculaire du gène *tetM*. Aucune association entre les complexes clonaux MLST et les résistances observées n'a été observée.

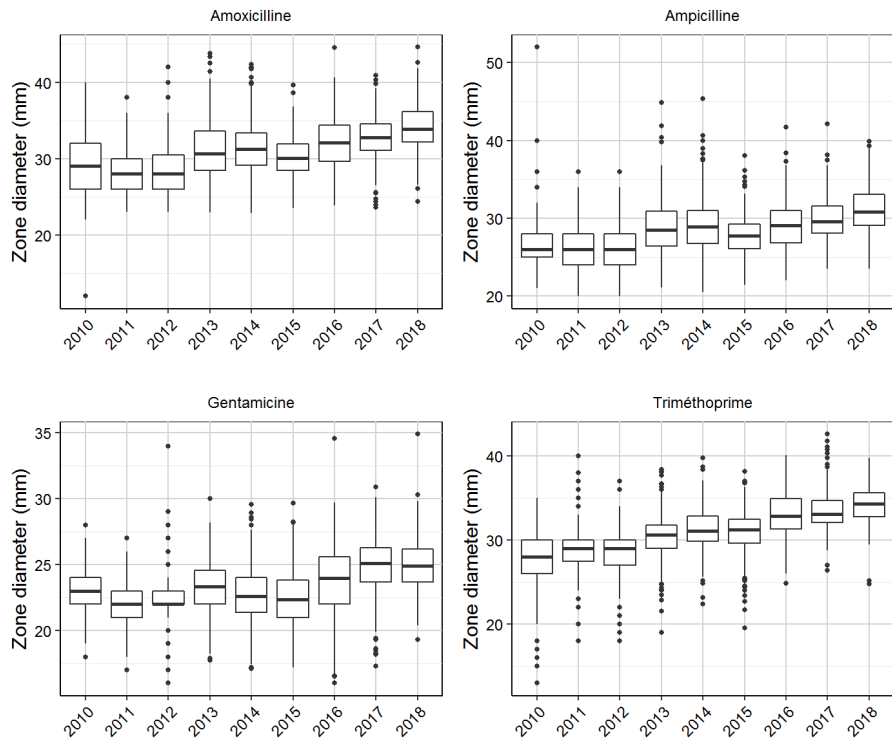
Bien que des souches d'origine non humaines aient été décrites comme résistantes à l'ampicilline, à l'amoxicilline ou à la gentamicine dans d'autres régions du monde (39, 40), aucune observation similaire n'a été faite en France pour des souches cliniques. Le suivi des tendances de la sensibilité de *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 (41, 42). L'analyse des génomes des souches alimentaires et environnementales soulignent sur les souches *Lm* de 2018 la présence du gène *aacA4* (impliqué dans résistance à l'amikacine et tobramycine) pour 16 souches, du gène *aphA* (impliqué dans la résistance à gentamicine, kanamycine et neomycine) pour 6 souches et du gène *tetM* pour 23 souches.

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 2018 (Légende : le trait noir indique la valeur de référence EUCAST définissant la résistance). A : Histogrammes ; B : Boîtes à moustaches.

A



B



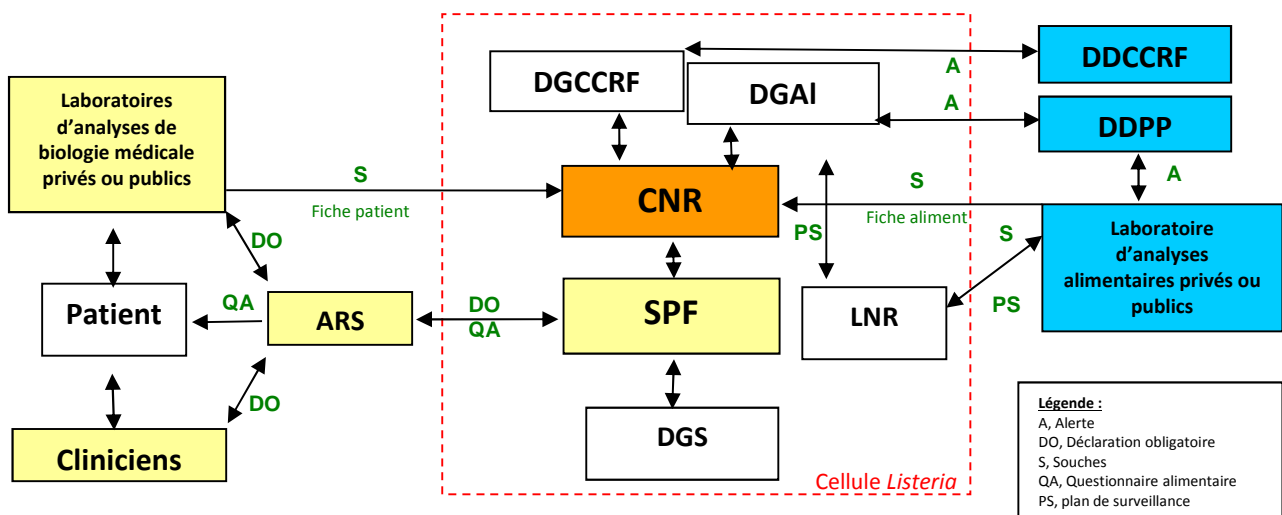
3.5. INTERFACE AVEC LES RESEAUX DE SURVEILLANCE NATIONAUX OU INTERNATIONAUX

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 (43). 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.

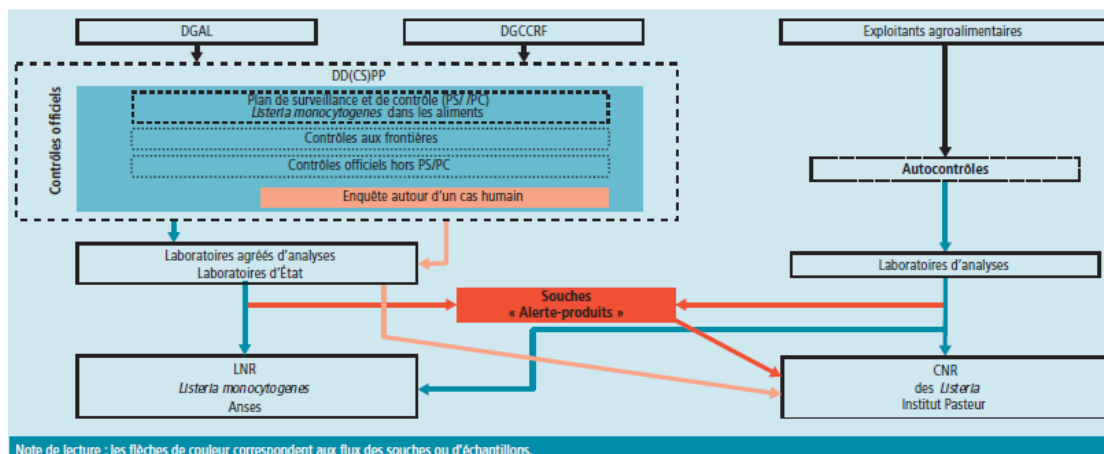
Le rôle du CNRL dans la surveillance est présenté dans la Figure 19.

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 (44))



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 (45).

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, et les types cgMLST (CT) de ces souches. Ce tableau signale aussi les caractéristiques microbiologiques similaires des souches françaises à des alertes européennes ou internationales.

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. Selon la définition légale d'une toxi-infection alimentaire collective, la listériose n'en fait pas partie et ce point serait à reconsidérer pour tenir compte des gastroentérites à *L. monocytogenes* maintenant prouvées.

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) (32, 46), 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) (32, 46). 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 transmises. 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. Le CNRL réalise chaque semaine la recherche du résistome (gènes impliqués dans la tolérance à des désinfectants comme les ammoniums quaternaires et de la résistance aux antibiotiques) et du virulome (gènes de virulence) des souches de *L. monocytogenes* issues d'alertes produits ce qui permet d'informer les DDPP locales qu'un produit comme le chlorure de benzalkonium ne doit pas être utilisé car la souche présente une tolérance.

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, triméthoprime, 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 2018 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 (47) 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. Des alertes sur la surveillance permanente des informations françaises web sur les *Listeria* est également adressé à SPF ainsi qu'aux autres membres de la cellule *Listeria*.

DGS – DGAL – 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.

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

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 (génométypage 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 2018 :

- au groupe de travail *Listeria* du réseau européen des maladies d'origine hydrique et alimentaire (FWD) (M. Lecuit & A. Leclercq) ;
- à la publication de Joint ECDC-EFSA Rapid Outbreak Assessments (ROAs) for *L. monocytogenes* décrit au chapitre 4.8 ;
- à un poster à l'ESCAIDE, Malte, 21-23 Novembre 2018 Einöder-Moreno M, Rizzi V, Felix F, Rimhanen-Finne R, Leinonen E, Kanagarajah S, Jernberg C, Lecuit M, Leclercq A, Albert A, Schmid D, Pietzka A, Takkinen J & International Outbreak Investigation Team. Multi-country outbreak of listeriosis due to *Listeria monocytogenes*, multi-locus sequence type 6, infections probably linked to frozen corn, European Union 2015–2018 (<https://simul-europe.com/2018/esc/HtmlPage1.html?prodId=12.4.pdf.jpg>) ;
- 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. *Eurosurveillance* 23(33);
- à la révision de l'Atlas de surveillance Food and Waterborne diseases (données 2017) ;
- à participer à l'actualisation de la base TESSY par SPF avec les données françaises ;
- 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 2017),
- à une discussion téléphonique en Octobre 2018 avec le FWD ECDC sur l'impact d'un point de vue légale des ROA type UI-426;
- à une enquête sur « Evaluation of the European FWD Surveillance System (EPHESUS) » <https://sites.google.com/a/epiconcept.fr/ephesus/home> en février 2018.
- A une enquête sur « Criteria for *Listeria* multi-country cluster detection » pour l'Advisory Forum de l'ECDC en Septembre 2018.

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 (DGAL, DGCCRF, SPF), qui les communiquent au CNRL.

Ce système est complété au niveau mondial par le réseau INFOSAN de l'OMS. Le CNRL/COMS est contacté pour expertiser certaines alertes en relation avec des urgent inquiries ECDC (Chapitre 4.5.). Le CNR a communiqué des séquences génomiques françaises :

- dans le cadre du RASFF 2018.0802 (UI-467) aux autorités compétentes norvégiennes concernant du fromage français,

- dans le cadre du RASFF 2018.0216 (UI-444) à l'EURL Lm concernant la souche d'autocontrôle d'environnement où du maïs avait été manipulé.
- dans le cadre de RASFF 2016.1290, 2017.1319 et 2017.1546 (UI-509) concernant une entreprise française productrice de produits du saumon manufacturé en Pologne et relié au cluster FR202.

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. A. Leclercq a été coordinateur scientifique de ce programme de validation internationale de méthodes de référence dont ces dernières (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 LNRI. 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 2018, l'EURL Lm a sollicité le CNRL dans le cadre de 3 Urgent Inquiries UI-426, UI-444 (Maïs congelés) et UI-509 (Saumon), pour répéter les analyses faites par le CNRL et préalablement communiquées à l'ECDC/EFSA/DG SANTE.

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 (48, 49). 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.

Le CCOMS a ainsi formé des stagiaires désireux de s'initier aux techniques de surveillance et de typage de *Lm*. En 2018, une stagiaire, Dr Monika KURPAS, de l'Institut Vétérinaire de Pologne et une chercheuse invitée, Dr Hsiu-Jung LO du National Health Research Institutes de Taiwan ont été formées au CCOMS/CNRL pour apprendre ce qu'est un système de surveillance nationale pour *Listeria* et les méthodes employées dont le cgMLST. Le CNRL répond aux sollicitations de l'OMS et apporte une assistance technique en cas de crise sanitaire.

En 2018, A. Leclercq a participé aux réunions du GOARN sur les alertes internationales concernant l'UI-444 (maïs surgelé) transformé en INFOSAN Alert (Multi-Country Outbreak of listeriosis linked to internationally distributed frozen vegetables from Hungary) et l'épidémie en Afrique du Sud.

Assistance à la gestion de l'épidémie de listériose en Afrique du Sud

Le CCOMS a été fortement impliqué dans la gestion de la plus grande épidémie de listériose rapportée jusqu'à présent, impliquant 1060 cas (janvier 2017 à juillet 2018) en Afrique du Sud :

- Mission de 3 semaines (Alexandre Leclercq) du 15 mai au 3 juin 2018 à Johannesburg, auprès du National Institute for Communicable Diseases (NICD), en tant qu'expert de l'OMS pour la sécurité sanitaire des aliments, GOARN, et membre de la WHO / NICD Joint *Listeria* Incident Management Team. Les missions comprenaient un appui technique pour la gestion des épidémies, des conseils au Ministère de la santé et de l'agriculture sur la mise en œuvre de la surveillance des aliments envers *Lm* et l'établissement de critères microbiologiques pour *Lm*, ainsi que la participation à la formation d'inspecteurs des aliments. Ceci venait en complément de la mission début 2018 effectuée par Mathieu Tourdjman (SPF) en lien avec le CCOMS sur l'investigation et la surveillance épidémiologique de l'infection.

- le CCOMS a analysé par cgMLST les séquences de souches transmises par le NCID et construction en cours (Dr M. Maury) d'une base de données sur les génomes sud-africains de *Lm* avec le NICD (Dr A. Smith).

Le CCOMS a participé pour le Département de la sécurité sanitaire des aliments et des zoonoses de l'OMS, INFOSAN (Dr. C. Savelli), à une publication de la série «Food Safety Digests» sur la «*Listeria monocytogenes* and Listeriosis» mettant à jour les gestionnaires de risques, les détaillants en alimentation et les consommateurs sur ces importantes questions relatives à la sécurité alimentaire.

Office International des Epizooties (OIE)

Le CNRL à travers le CCOMS répond aux sollicitations de l'OIE sur des questions concernant *Listeria* dont la révision du chapitre *Listeria monocytogenes* pour 2018.

3.6. ENQUETE OU ETUDES PONCTUELLES CONCOURANT A LA SURVEILLANCE

Etude MONALISA: Multicentric Observational National Analysis of LIsteriosis and Listeria

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, 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.

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.

Les inclusions dans la cohorte MONALISA se poursuivent, pour les neurolistérioses et les infections materno-néonatales. A la suite de ce premier travail, 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) (Charlier et al., 2018, Clin Infect Dis (1)).

- **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).

- **MONALISA-GENBIO :** 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 (Lluis Quintana, Etienne Patin, 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

En 2018, le diagnostic de listériose a été porté après 15 jours d'hospitalisation pour 21 cas (20 en 2017), faisant discuter la possibilité de listérioses nosocomiales (la mise en évidence de cas de listériose groupés temporellement et géographiquement (même hôpital, voire même service)) (50, 51). Pour 16 de ces 21 cas (76%) aucune inspection complémentaire dans l'établissement n'a été demandée par les autorités sanitaires, soit parce que la présentation clinique initiale était compatible avec le diagnostic de listériose, soit parce qu'une consommation d'au moins un aliment extérieur à l'hôpital avait été documentée avant le diagnostic de listériose. Pour 5 de ces 21 cas (24%), une inspection des cuisines hospitalières a été diligentée par les autorités de santé. Ces inspections ont mis en évidence une contamination de l'environnement des cuisines d'un établissement comme source de contamination probable pour au moins 1 cas (Cluster 232 du cgMLST Type CT4665).

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-traitances et remplissant, pour les LABM clients d'origine, les fiches de renseignements du CNR sans connaître l'ensemble des données.

4.2. CLUSTERS CGMLST ET EPIDEMIES

Depuis Janvier 2015, le CNRL utilise le séquençage du génome complet des souches (WGS) et la méthode de typage core génome MLST (cgMLST) (17, 18).

Sur les 94 clusters cgMLST investigués en 2018 par les autorités de santé, une source de contamination a été confirmée pour 20 (21%).

On arrive donc maintenant à une catégorisation des clusters en :

- clusters ponctuels, non évolutifs,
- clusters humains et alimentaires/environnementaux persistants, avec plusieurs cas humains,
- clusters majoritairement alimentaires/environnementaux persistants, avec très peu de cas humains.

[...]

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.

Tableau 6. Tableau récapitulatif des épidémies françaises de plus de 2 cas de 1992 à 2018

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	13	Andouille – Tour de France	8 mois
2015	2	Produit Corse	1,6 mois
2016	22	Reblochon	4 mois
2017	5	Produits de charcuterie, contamination persistante d'environnement agro-alimentaire artisanal	26 mois
2017	4	Brie au lait cru	8 mois

En 2018, les clusters investigués avec cause identifiée sont tous inférieurs à 2 cas et donc il est discutable de les appeler « Epidémie ».

4.3. TOXI-INFECTIONS ALIMENTAIRES COLLECTIVES

Aucune toxi-infection alimentaire collective à *Listeria monocytogenes* n'a été portée à notre connaissance en 2018.

Étant donné l'existence de gastroentérites à *L. monocytogenes*, la définition des toxi-infections alimentaires collectives devrait inclure maintenant *L. monocytogenes*.

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 2018, 1183 souches (2016 : 821) ont été adressées au CNRL dans le cadre des 424 alertes-produits DGAL, DDPP et des Armées de 2018 (2017 : 346). Ces souches incluaient 998 souches alimentaires, 184 souches d'environnements agroalimentaires, 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, demande à ses homologues étrangers les séquences génomiques assemblées ou les reads des souches *Lm* isolées des aliments incriminés.

En 2018, 294 notifications ont été faites à la Commission Européenne pour des denrées alimentaires avec des pathogènes alimentaires dont 120 (91 en 2017) concernaient *L. monocytogenes* (Tableau 7) comprenant 28 notifiées par la France et 6 par 4 pays étrangers ayant un lien avec un produit français (https://ec.europa.eu/food/safety/rasff_en). Le CNRL a participé à plus de 6 investigations RASFF dont le RASFF 2018.0802 sur du fromage français contaminé avec les autorités norvégiennes. [...].

En 2018, le **taux moyen d'exhaustivité de récupération des souches d'alertes-produits était de 62%** (2017 : 73%) alors qu'il est resté stable de 2011 à 2017, estimé à 72% en moyenne.

En 2018, 97% (comme en 2015, 2016, 2017) 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. Cette confirmation de l'espèce est importante dans le cadre des suites économiques, judiciaires voire diplomatiques de ces alertes produits.

La répartition par groupe PCR des 1141 souches de *Lm* isolées d'aliments et d'échantillons environnementaux dans le cadre des alertes-produits était la suivante :

- Groupe PCR IIa (sérovary 1/2a et 3a) : 602 souches (53% ; 71% en 2017)
- Groupe PCR IIb (sérovary 1/2b, 3b et 7) : 108 souches (9% ; 7% en 2017)
- Groupe PCR IIc (sérovary 1/2c et 3c) : 215 souches (19% ; 8% en 2017)
- Groupe PCR IVb (sérovary 4b, 4d et 4e) : 214 souches (19% ; 14% en 2017)
- Groupe PCR IVb-V1 (sérovary 4b) : 2 souche (0% ; <1% en 2017)
- Groupe PCR L (sérovary 4a, 4ab, 4c) : 0 souche (0% ; <1% en 2017)

En 2018, les complexes clonaux de *Lm* les plus fréquents à l'origine d'alertes-produits sont, par ordre décroissant, le CC9, le CC121, le CC5, le CC1, le CC6, le CC37, le CC204 et le CC8 ce qui diffère de la répartition de 2017.

Tableau 7. Information des alertes RASFF notifiées en 2018 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
Alert	14/12/2018	2018.3650	France	<i>Listeria monocytogenes</i> (<100 CFU/g) in blood sausages from France	meat and meat products (other than poultry)
information for attention	10/12/2018	2018.3591	France	<i>Listeria monocytogenes</i> (200 CFU/g) in tuna hummus from Belgium	other food product / mixed
Alert	07/12/2018	2018.3573	France	<i>Listeria monocytogenes</i> (<10 CFU/g) in semi-soft cow's milk cheese from France	milk and milk products
Alert	28/11/2018	2018.3452	France	<i>Listeria monocytogenes</i> (70 CFU/g) in smoked salmon trimmings from the United Kingdom	fish and fish products
information for follow-up	16/11/2018	2018.3318	France	<i>Listeria monocytogenes</i> (10 CFU/g) in frozen raw foie gras from Bulgaria	poultry meat and poultry meat products
information for attention	13/11/2018	2018.3262	France	<i>Listeria monocytogenes</i> (<10 CFU/g) in chilled surimi and crab salad from Belgium	crustaceans and products thereof
Alert	07/11/2018	2018.3183	France	<i>Listeria monocytogenes</i> (> 1500 CFU/g) in mini blinis from France	other food product / mixed
information for attention	23/10/2018	2018.2989	France	<i>Listeria monocytogenes</i> (<10 CFU/g) in roasted honey ham from France	meat and meat products (other than poultry)
Alert	19/10/2018	2018.2954	France	<i>Listeria monocytogenes</i> (320 CFU/g) in frozen roasted chicken breast slices from Poland	poultry meat and poultry meat products
Alert	10/10/2018	2018.2857	France	<i>Listeria monocytogenes</i> (<100 CFU/g) in chilled smoked poultry sausages (knacks) from France	poultry meat and poultry meat products
Alert	05/10/2018	2018.2795	France	<i>Listeria monocytogenes</i> (90 CFU/g) in mortadella with pistachio from Italy	meat and meat products (other than poultry)
Alert	30/08/2018	2018.2459	France	<i>Listeria monocytogenes</i> (10 CFU/g) in mozzarella di bufala from Italy	milk and milk products
Alert	28/08/2018	2018.2433	France	<i>Listeria monocytogenes</i> (120; 90; 110 CFU/g) in coppa from Italy	meat and meat products (other than poultry)
information for attention	28/08/2018	2018.2435	France	<i>Listeria monocytogenes</i> (300 CFU/g) in cooked whelks from France	gastropods
information for attention	22/08/2018	2018.2392	France	<i>Listeria monocytogenes</i> (<10 CFU/g) in bacon from Italy	meat and meat products (other than poultry)
Alert	21/08/2018	2018.2370	France	<i>Listeria monocytogenes</i> (> 1500 CFU/g) in chilled pre-cooked falafel from France	prepared dishes and snacks
Alert	16/08/2018	2018.2323	France	<i>Listeria monocytogenes</i> (540 CFU/g) in gorgonzola mascarpone from Italy	milk and milk products
Alert	02/08/2018	2018.2212	France	<i>Listeria monocytogenes</i> (<10 CFU/g) in raw milk cheese from France	milk and milk products
Alert	26/07/2018	2018.2130	France	<i>Listeria monocytogenes</i> (<10 CFU/g) in pasteurized milk sheep's and goat's cheese from France	milk and milk products
Alert	26/07/2018	2018.2134	France	<i>Listeria monocytogenes</i> (<10; <40 CFU/g) in raw milk goat's cheese from France	milk and milk products
Alert	24/07/2018	2018.2093	Germany	<i>Listeria monocytogenes</i> in sheep's and goat's cheese from France	milk and milk products
Alert	16/07/2018	2018.2003	France	<i>Listeria monocytogenes</i> (400 CFU/g) in chilled smoked trout from Estonia, via Belgium	fish and fish products
Alert	29/06/2018	2018.1833	France	<i>Listeria monocytogenes</i> (<10 CFU/100g) in sliced smoked salmon from Estonia, via Belgium	fish and fish products
Alert	02/05/2018	2018.1198	France	<i>Listeria monocytogenes</i> (130 CFU/100g) in mozzarella cheese from Italy	milk and milk products
information for attention	02/05/2018	2018.1200	France	<i>Listeria monocytogenes</i> (3100 CFU/g) in raw milk sheep cheese from France	milk and milk products
Alert	17/04/2018	2018.1042	Netherlands	<i>Listeria monocytogenes</i> in raw milk cheeses from France	milk and milk products

Classification RASFF	Date de notification	Référence RASFF	Pays notifiant	Sujet	Catégorie de produits alimentaires
Alert	17/04/2018	2018.1038	Netherlands	<i>Listeria monocytogenes</i> in various cheeses from France	milk and milk products
Alert	13/04/2018	2018.1016	France	<i>Listeria monocytogenes</i> (>100 to <10000 CFU/g) in goat cheese from France	milk and milk products
Alert	11/04/2018	2018.0966	France	<i>Listeria monocytogenes</i> (>100 CFU/g) in chilled smoked trout and salmon from France, processed in Poland, with raw material from Norway	fish and fish products
Alert	28/03/2018	2018.0833	Germany	<i>Listeria monocytogenes</i> (presence /25g) in soft goat cheese from France	milk and milk products
information for attention	23/03/2018	2018.0802	Norway	foodborne outbreak caused by <i>Listeria monocytogenes</i> in soft cheese from France	milk and milk products
Alert	21/03/2018	2018.0781	Netherlands	<i>Listeria monocytogenes</i> (<10; 120; 6000; <40; 2800; 9600 CFU/g) in raw milk brie cheese from France	milk and milk products
information for attention	27/02/2018	2018.0520	France	<i>Listeria monocytogenes</i> (440; 570 CFU/g) in chilled nems from France	meat and meat products (other than poultry)
information for attention	16/02/2018	2018.0407	France	<i>Listeria monocytogenes</i> (<10 CFU/g) in chilled cooked ham from France	meat and meat products (other than poultry)
information for follow-up	05/01/2018	2018.0040	Belgium	<i>Listeria monocytogenes</i> (<10 CFU/g) in raw milk cheese from France	milk and milk products

4.5. ALERTES PRODUITS DGCCRF

Les 7 alertes-produits provenant de la DGCCRF ou de ses laboratoires survenus en 2018 ont donné lieu à la réception au CNRL de 7 souches. Ces alertes sont mises en place lorsque des échantillons alimentaires ne répondent pas aux critères microbiologiques règlementaires 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 2018, 91% (71/78 ; 2017 : 87%) des listérioses neuroméningées ont été soumises à cette d'enquête, chiffre en augmentation depuis 2006 (59%). Selon les rapports communiqués par la DGAL, 45 (2017 : 44 ; 1996 : 24) investigations ont été suivies d'enquêtes locales donnant lieu à des prélèvements dans le réfrigérateur du patient.

En 2018, parmi les 9 cas (2017 : 13) pour lesquels des souches ont été isolées du réfrigérateur du patient ou de ses lieux d'achats, à 5 (2017 : 2 ; 1996 : 10/24) reprises, la souche du patient était similaire en cgMLST à la souche isolée des aliments de son réfrigérateur ou de l'environnement du lieu de production d'un aliment qu'il a consommé (52).

Ainsi, **les prélèvements à domicile effectués pour les cas de listérioses neuroméningées sont un complément utile à la DO et permettent, dans environ 17% des cas où *Lm* est isolé (2017 : 15%), d'identifier rapidement la source de contamination.**

4.7. «URGENT INQUIRIES» DE L'ECDC

En 2018, le CNRL a été informé d'alertes-produits communautaires soit par l'ECDC au moyen de la plateforme EPIS, soit par la DGAL au moyen du réseau RASFF (alertes-produits), soit par l'OMS/FAO au moyen du réseau INFOSAN. 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 accord avec SPF et la DGAI, une réponse sur l'occurrence du cgMLST type dans les souches cliniques et alimentaires françaises est rapportée sur le site EPIS et la séquence est archivée dans le logiciel en ligne BIGSdb *Listeria* au moyen d'un identifiant.

En 2018, le CNRL a investigué 11 « urgent inquiries » par cgMLST (8 en 2017) (Tableau 8) 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-444, dont la France avait identifié l'origine par un résultat d'autocontrôle en 2017, a donné lieu à une publication Rapid Risk assessment (RRA, Marc Lecuit, Alexandre Leclercq, Mylène Maury, Alexandra Moura co-auteurs) sur le site de l'ECDC: *Multi-country outbreak of Listeria monocytogenes serogroup IVb, multi-locus sequence type 6, infections linked to frozen corn and possibly to other frozen vegetables – first update* (<https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/sp.efsa.2018.EN-1448>)

Abstract: An outbreak of invasive *Listeria monocytogenes* infections confirmed by whole-genome sequencing (WGS) and linked to frozen corn and possibly to other frozen vegetables has been ongoing in Austria, Denmark, Finland, Sweden and the United Kingdom since 2015. As of 15 June 2018, 47 cases were reported and nine patients died. WGS analysis of 29 non-human *L. monocytogenes* isolates found them to be closely related to the multi-country human cluster of *L. monocytogenes* serogroup IVb, multi-locus sequence type 6. The non-human isolates were obtained from frozen corn, frozen vegetable mixes including corn, frozen spinach products, frozen green beans and two environmental samples. The strong microbiological link between the human and the non-human isolates is indicative of a common source related to frozen corn and other frozen vegetable mixes persisting in the food chain. Traceability information for the contaminated products pointed to the source of contamination in a Hungarian freezing plant. It is possible that frozen vegetables other than corn processed in this plant, could also be a vehicle of human infection. The information available confirms contamination within the Hungarian plant, but thorough sampling and testing are needed to identify the source of contamination at the plant concerned. On 29 June 2018, the Hungarian Competent Authority banned the marketing of all frozen vegetable products produced by the Hungarian plant, and ordered their immediate withdrawal and recall. This restrictive measure is likely to significantly reduce the risk of human infections and contain the outbreak. Any potentially contaminated frozen vegetables could still represent a possible risk to consumers until completely withdrawn and recalled. New invasive listeriosis cases may also be identified due to the long incubation period, the long shelf-lives of these products, and potential consumption of frozen vegetable products bought by consumers before their recall and eaten without being properly cooked.

Des cas humains survenus en France ont été reliés microbiologiquement à des souches de ces alertes-produits internationales.

Tableau 8. Liste des Urgent Inquiries auxquelles le CNRL a participé en 2018 (Source : EPIS database, ECDC, Stockholm).

Référence	Titre	Ouverture	Pays
UI-517	Outbreak cluster of <i>Listeria monocytogenes</i> in Switzerland	24/10/2018	Suisse
UI-516	<i>Listeria</i> outbreak in Germany	24/10/2018	Allemagne
UI-426	<i>Listeria</i> outbreak in Denmark (Update by United States)	21/09/2018	Danemark
UI-509	Two clusters of listeriosis allocated to RASFF notifications 20181078	17/09/2018	Allemagne
UI-492	Prolonged multi-country cluster of <i>Listeria monocytogenes</i> since 2009	04/07/2018	Allemagne
UI-490	Three clusters of <i>Listeria monocytogenes</i> in England	02/07/2018	Royaume-Uni
UI-467	Suspicion of <i>Listeria monocytogenes</i> in soft cheese	06/04/2018	Norvège
UI-461	Pregnancy related cases of listeriosis in the United Kingdom	26/01/2018	Royaume-Uni
UI-460	Outbreak of listeriosis, Austria 2015-2017	25/01/2018	Autriche
UI-452	<i>Listeria monocytogenes</i> ST 1247 Outbreak in Denmark	19/12/2017	Danemark
UI-444	Three clusters of <i>Listeria monocytogenes</i> in Finland / RASFF notification 2018.0216	03/11/2017	Finlande

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 2018, Marc Lecuit a encadré des étudiants ou a réalisé les enseignements suivants :

- Cours en M1 et M2 de Microbiologie et Biologie cellulaire, Université Paris 5,6 et 7, ENS, 2018.
- Cours de Maladies infectieuses et Microbiologie, Faculté de Médecine de l'Université Paris Descartes.
- Direction du travail de 2 étudiants en thèses de doctorat et de 6 post-doctorants.
- Participation à la formation RESER pour des biologistes du Réseau international des Instituts Pasteur, Institut Pasteur, 26 novembre 2018, sur « WGS et référence : exemple *Listeria monocytogenes* ».

En 2018, Caroline Charlier a encadré des étudiants ou a réalisé les enseignements suivants :

- Etudiants en Médecine de DFGSM3. DFGSM3 : « Infection et grossesse », 2 heures, 2018.
- DIU - Antibiotique et autres traitements anti-infectieux Poitiers. Infections et grossesse, 3 heures, 2018.
- DU - Infection et grossesse Paris 11. « Listériose », 1 heures, 2018.
- DIU - Stratégies thérapeutiques et préventives en pathologie infectieuse Paris 5. « Anti-infectieux et grossesse, cas cliniques », 2 heures, 2018.
- DES - Maladies Infectieuses. Journée sur Infections et grossesse 8 heure, Octobre 2018.
- DES - Médecine Générale Paris Descartes, 2 heures, 2018.
- Animation d'un staff en réanimation à Louis Mourier, Colombes « Listériose en 2018 », 1 heure, 2018.

En 2018, Alexandre Leclercq a encadré des étudiants ou a réalisé les enseignements suivants :

- participé à l'atelier GFN / AGISAR sur les enquêtes et la surveillance des maladies d'origine alimentaire (15 au 19 octobre 2018, NICD Johannesburg, Afrique du Sud) avec des 2 conférences sur « La sécurité sanitaire des aliments concernant la listériose » et « Technologies de génotypage de prochaine génération: séquençage du génome entier (WGS) et utilisation des données WGS ». Le CNR a participé à des ateliers pratiques de laboratoire destinés à partager des connaissances et des compétences dans des domaines tels que l'identification phénotypique d'espèces de *Listeria* ou les tests antimicrobiens avec différents délégués OMS de pays Africains.
- participé au comité de doctorat le 14 juillet 2018 du Dr. N. Amajoud (Laboratoire de biologie et de santé, Université Abd Al Malek Essaadi, Tetouan, Maroc), coopération pour la caractérisation des souches alimentaires de *Listeria* en 2016.

- participé à la formation RESER pour des biologistes du Réseau international des Instituts Pasteur, Institut Pasteur, 19 novembre 2018, sur « L'importance de la relation microbiologie-épidémiologie dans la surveillance : exemple pratique *Listeria* ».

5.1.2. Accueil de stagiaires

En 2018, le CNRL a :

- travaillé avec le Dr. Alexandra MOURA (depuis 2014), chercheur post-doctorante dont le projet s'intitule « Génomique des populations des souches de *Listeria monocytogenes* » ;
- interagi par webconférence avec le Dr Anthony Smith du NICD Laboratoire Central des bactéries Entériques, Afrique du Sud sur l'analyse des résultats de cgMLST avec le logiciel bioNumerics dans le cadre de la gestion de l'épidémie de listériose Sud-Africaine;
- accueilli le Dr. Monika KURPAS de l'Institut national de recherche vétérinaire, Pulawy, Pologne, du 04 avril 2018 au 04 mai 2018, pour une formation sur le processus analytique et la constitution d'une base de données génomique par cgMLST ;
- accueilli le Dr Hsiu-Jung LO de l'Institut National de Recherche en Santé de Taiwan, du 29 octobre 2018 au 31 août 2019, pour une formation sur le processus analytique et la génomique, création d'une base de données génomiques à Taïwan pour la surveillance des *Listeria* ;
- participé au programme RESER, réseau d'étude et de surveillance des pathogènes émergents, Institut Pasteur, Paris, France. Formation du responsable scientifique des laboratoires de Tunisie, Maroc, Côte d'Ivoire, Madagascar, Cameroun et Sénégal par des cours avec conférences WHOCCCL sur «WGS et surveillance de la *Listeria*» et «Interaction entre microbiologie et épidémiologie lors d'une surveillance et d'une épidémie», stage de 3 scientifiques du Maroc et du Sénégal, du Centre national de référence pour la méthode et la surveillance de la bactérie *Listeria*, du 10 au 20 novembre 2018.

5.1.3. Liste des guides élaborés

Charlier C, Lecuit M. Listériose. EPilly 2018.

Lecuit M, Charlier C. Listériose. Chapitre 67 Pilly Edition 2018.

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

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

Leclercq A, Charlier-Woerther C, Disson O, Jacquet C, Martin P, Rocourt J, Lecuit M. Chapitre 69 : *Listeria monocytogenes*. In : Précis de bactériologie clinique, ESKA, Paris.

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

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.

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.

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 au site des CNR de l'Institut Pasteur formant le LREMS (Laboratoire de Référence et d'Expertise Multisite) 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 2018, le CNRL a reçu environ 260 demandes d'information par e-mail (Listeria@pasteur.fr) (~5/semaine) et environ 470 appels téléphoniques (~9/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 puis dans les audits internes 2018.

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)
- demandes de conseils en cas de crise sanitaire

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)
- demandes de conseils en cas de crise sanitaire

Particuliers

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

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 2018, A. Leclercq a continué à participer aux groupes d'experts ANSES sur « l'attribution des sources des maladies infectieuses d'origine alimentaire ».

Conseil auprès de Ministères

Par sa participation à la cellule *Listeria*, le CNRL est en contact presque quotidien avec les services concernés de Santé Publique France (Ministère de la Santé), de la DGAL (Ministère de l'Agriculture) et de la DGCCRF (Ministère de l'Economie).

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 2018, les responsables du CNRL ont participé aux réunions concernant l'application 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* utilisant le cgMLST et le schéma cgMLST établi par le CNRL.

Expertise de publications et de projets scientifiques

En 2018, le CNRL a participé à l'examen d'articles dans des journaux nationaux et internationaux à comités de lecture (PLOS One, Epidemiology and Infection, Science Reports, Clinical Microbiology and Infection, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, International Journal of Food Microbiology, Emergence Microbes & Infections, Foodborne Pathogens and Disease, Genes, Food Research International, International Journal of Infectious Diseases, Journal of Food Protection, 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 (Citation) pour des medias

Leclercq A. Comment l'Europe va renforcer la surveillance des *Listeria*, Process Alimentaire, 24/09/18.
<http://www.processalimentaire.com/Qualite/Comment-l-Europe-va-renforcer-la-surveillance-des-Listeria-34863>

Lecuit M. La mystérieuse *Listeria* qui a fait paniquer Buffalo Grill, Mediapart, 16/11/18.
<https://www.mediapart.fr/journal/france/161118/la-mysterieuse-Listeria-qui-fait-paniquer-buffalo-grill?onglet=full>

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 2018

6.1.1. Contributions aux études épidémiologiques

Retrospective validation of whole genome sequencing-enhanced surveillance of listeriosis in Europe, 2010 to 2015

*Article publié: Van Walle I, Björkman JT, Cormican M, Dallman T, Mossong J, Moura A, Pietzka A, Ruppitsch W, Takkinen J; European Listeria Wqs Typing Group. Retrospective validation of whole genome sequencing-enhanced surveillance of listeriosis in Europe, 2010 to 2015. *Euro Surveill.* 2018 Aug;23(33) (53).*

Abstract:

Background and aim: The trend in reported case counts of invasive *Listeria monocytogenes* (*Lm*), a potentially severe food-borne disease, has been increasing since 2008. In 2015, 2,224 cases were reported in the European Union/European Economic Area (EU/EEA). We aimed to validate the microbiological and epidemiological aspects of an envisaged EU/EEA-wide surveillance system enhanced by routine whole genome sequencing (WGS).

Methods: WGS and core genome multilocus sequence typing (cgMLST) were performed on isolates from 2,726 cases from 27 EU/EEA countries from 2010-15.

Results: Quality controls for contamination, mixed *Lm* cultures and sequence quality classified nearly all isolates with a minimum average coverage of the genome of 55x as acceptable for analysis. Assessment of the cgMLST variation between six different pipelines revealed slightly less variation associated with assembly-based analysis compared to reads-based analysis. Epidemiological concordance, based on 152 isolates from 19 confirmed outbreaks and a cluster cutoff of seven allelic differences, was good (sensitivity > 95% for two cgMLST schemes of 1,748 and 1,701 loci each; PPV 58–68%). The proportion of sporadic cases was slightly below 50%. Of remaining isolates, around one third were in clusters involving more than one country, often spanning several years. Detection of multi-country clusters was on average several months earlier when pooling the data at EU/EEA level, compared with first detection at national level.

Conclusions: These findings provide a good basis for comprehensive EU/EEA-wide, WGS-enhanced surveillance of listeriosis. Time limits should not be used for hypothesis generation during outbreak investigations, but should be for analytical studies.

Multi-country outbreak of *Listeria monocytogenes* sequence type 8 infections linked to consumption of salmon products

Joint ECDC-EFSA rapid Outbreak assessment publié: Eindöder-Moreno M, Kotila S, Niskanen T, Severi E, Takkinen J, Amore G, Guerra B, Liebana EC, Mangoe I, Rizzi V, Felix B, Leblanc JC, Schjorring S, Muller L, Tourdjman M, Leclercq A, Maury M, Lecuit M, Halbedel S, Holzer A. Multi-country outbreak of *Listeria monocytogenes* sequence type 8 infections linked to consumption of salmon products – 25 October 2018. Stockholm and Parma; ECD/EFSA; 2018. (<https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/Listeria-multi-country-outbreak-october-2018.pdf>)

Abstract: A multi-country outbreak of 12 listeriosis cases caused by *Listeria monocytogenes* sequence type (ST) 8 has been identified through whole genome sequencing (WGS) analysis in three EU/EEA countries: Denmark(6 cases), Germany(5) and France(1). Four of these cases have died due to or with the disease. It is likely that the extent of this outbreak has been underestimated since the outbreak was identified through sequencing and only a subset of the EU/EEA countries routinely use this advanced technique to characterise *L. monocytogenes* isolates. The first case was sampled in October 2015 in Denmark and the most recent case was reported in May 2018 in Germany.

In August 2017, Denmark identified the first cluster of cases, which was investigated and linked to the consumption of ready-to-eat cold-smoked salmon produced in Poland [1]. Control measures were implemented and the Member States and competent authorities were informed. In October 2017, France reported the identification of a matching *L. monocytogenes* strain in food isolates from marinated salmon originating from the same Polish processing company as identified in the Danish outbreak investigation. This supports the hypothesis that contamination may have occurred at the processing company in Poland. However, due to the lack of WGS data on the isolates found in the environmental and food samples taken at the Polish processing plant, it is not possible at present to confirm the contamination with the *L.monocytogenes* ST8 outbreak strain at the suspected Polish plant. Moreover, until detailed information on the Norwegian primary producers of the salmon used in the contaminated batches is reported and assessed, possible contamination at primary production level cannot be excluded either.

Although control measures were implemented following the Danish outbreak investigation in September 2017, the identification of the same strain in a salmon product in France and a new human case in Germany suggest that the source of contamination is still active and contaminated products have been distributed to other EU countries than Denmark. Until the source of infection has been eliminated, new invasive listeriosis cases may still occur. Pregnant women, the elderly and immunocompromised individuals are at increased risk of invasive listeriosis, which is associated with severe clinical course and potentially death.

LiSEQ - whole-genome sequencing of a cross-sectional survey of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods and human clinical cases in Europe.

En collaboration avec IT.J. Dallman, Public Health England Gastrointestinal Bacteria Reference Unit, 61 Colindale Avenue, London

Article publié: Painset A, Björkman JT, Kiil K, Guillier L, Mariet JF, Félix B, Amar C, Rotariu O, Roussel S, Perez-Reche F, Brisse S, Moura A, Lecuit M, Forbes K, Strachan N, Grant K, Møller-Nielsen E, Dallman TJ. LiSEQ - whole-genome sequencing of a cross-sectional survey of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods and human clinical cases in Europe. *Microb Genom.* 2019 Feb; 5(2) (54).

Abstract: We present the LiSEQ (*Listeria* SEQuencing) project, funded by the European Food Safety Agency (EFSA) to compare *Listeria monocytogenes* isolates collected in the European Union from ready-to-eat foods, compartments along the food chain (e.g. food-producing animals, food-processing environments) and humans. In this article, we report the molecular characterization of a selection of this data set employing whole-genome sequencing analysis. We present an overview of the strain diversity observed in different sampled sources, and characterize the isolates based on their virulence and resistance profile. We integrate into our analysis the global *L. monocytogenes* genome collection described by Moura and colleagues in 2016 to assess the representativeness of the LiSEQ collection in the context of known *L. monocytogenes* strain diversity.

6.1.2. Méthodes de diagnostic et caractérisation des souches atypiques

Atypical hemolytic Listeria innocua are virulent, albeit less than Listeria monocytogenes.

En collaboration avec Roger Stephan, Institute for Food safety and Hygiene, Zurich, Suisse.

Article publié: Moura A, Disson O, Lavina M, Thouvenot P, Huang L, Leclercq A, Fredriksson-Ahomaa M, Eshwar AK, Stephan R, Lecuit M. Atypical hemolytic *Listeria innocua* are virulent, albeit less than *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun*. 2019 Jan 22. pii: IAI.00758-18 (3).

Abstract: *Listeria innocua* is considered as a non-pathogenic *Listeria* species. Natural atypical hemolytic *L. innocua* have been reported, but have not been characterized in detail. Here we report the genomic and functional characterization of isolates representatives from the two known natural hemolytic *L. innocua* clades. Whole genome sequencing confirmed the presence of *Listeria* pathogenicity islands (LIPI) characteristic of *Listeria monocytogenes* species. Functional assays showed that LIPI-1 and *inlA* genes are transcribed, and the corresponding gene products expressed and functional. Using in vitro and in vivo assays, we show that atypical hemolytic *L. innocua* are virulent, can actively cross the intestinal epithelium and spread systemically to the liver and spleen, albeit to a lower degree than the reference *L. monocytogenes* EGDc strain. Although human exposure to hemolytic *L. innocua* is likely rare, these findings are important for food safety and public health. The presence of virulent traits in some *L. innocua* clades supports the existence of a common virulent ancestor of *L. monocytogenes* and *L. innocua*.

6.1.3. Etudes épidémiologiques, microbiologiques et cliniques

Imaging of Human Neurolisteriosis: A Prospective Study of 71 Cases

Article: Charlier C, Poirée S, Delavaud C, Khoury G, Richaud C, Leclercq A, Hélénon O, Lecuit M; MONALISA Study Group. *Imaging of Human Neurolisteriosis: A Prospective Study of 71 Cases*. *Clin Infect Dis*. 2018 Oct 15;67(9):1419-1426 (1).

Abstract:

Background: Neurolisteriosis ranks among the most severe neurological infections. Its radiological features have not been thoroughly studied. We describe here 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 MONALISA study. Magnetic resonance and computed tomography images were studied by 2 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%), hemorrhages (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%], $P = .005$) and in patients with parenchymal images (abscess[es], nodule[s], or white matter images; 25/46 [54%] vs 23/25 without [92%], $P = .004$). Parenchymal images were associated with lower 3-month survival in the multivariable model (odds ratio 5.60, 95% confidence interval [1.42-29.6], $P = .02$).

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. Clinical Trials Registration: NCT01520597.

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. (2).

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. Taxonomie

Le CNRL a caractérisé une nouvelle espèce: *L. thailandensis* et continue une étude génomique du genre *Listeria* d'un point de vue taxonomique.

Listeria thailandensis sp. nov.

En collaboration avec C. Aguilhon, Recherche et Développement, bioMérieux, Marcy l'Etoile

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

Article publié: Leclercq A, Moura A, Vales G, Tessaud-Rita N, Aguilhon C, Lecuit M. *Listeria thailandensis* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2019 Jan;69(1):74-81 (15).

Abstract: During a screening of *Listeria* species in food samples in Thailand, a *Listeria*-like bacterium was recovered from fried chicken and could not be assigned to any known species. Phylogenetic analysis based on the 16S rRNA gene and on 243 *Listeria* core genes placed the novel taxon within the *Listeria aquatica*, *Listeria floridensis*, *Listeria fleishmannii* and *Listeria costaricensis* clade (*Listeria* sensu lato), with highest similarity to *L. floridensis* (98.9%) and *L. costaricensis* (98.8%). Whole-genome sequence analyses based on the average nucleotide blast identity (ANI<86%), the pairwise amino acid identity (AAI>64%) and on the percentage of conserved proteins (POCP>77%) with currently known *Listeria* species confirmed that the strain constituted a new taxon within the genus *Listeria*. At the phenotypical level, it differs from other *Listeria* species by the production of acid from d-tagatose and inositol. The name *Listeria thailandensis* sp. nov. is proposed for the novel species, and is represented by the type strain CLIP 2015/00305T (=CIP 111635T=DSM 107638T).

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

Dans le cadre de la résistance aux antibiotiques, le CNRL 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 CNRL valide dans les outils de sa plateforme BIGSdb une recherche des gènes responsables du mécanisme de tolérance de *L. monocytogenes* au chlorure de benzalkonium.

Le CNRL effectue actuellement une étude rétrospective de l'antibiorésistance des *Listeria monocytogenes* en France depuis 2011.

Epistatic control of intrinsic resistance by virulence genes in Listeria

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

Article en revision: Scotti M, Han L, Alvarez S, Leclercq A, Moura A, Lecuit M, Vazquez-Boland J. Epistatic control of intrinsic resistance by virulence genes in Listeria. PLoS Genet. 2018 Sep 4;14(9):e1007525 (55).

Abstract: Elucidating the relationships between antimicrobial resistance and virulence is key to understanding the evolution and population dynamics of resistant pathogens. Here, we show that the susceptibility of the gram-positive bacterium *Listeria monocytogenes* to the antibiotic fosfomycin is a complex trait involving interactions between resistance and virulence genes and the environment. We found that a FosX enzyme encoded in the Listerial core genome confers intrinsic fosfomycin resistance to both pathogenic and non-pathogenic *Listeria* spp.

However, in the genomic context of the pathogenic *L. monocytogenes*, FosX-mediated resistance is epistatically suppressed by two members of the PrfA virulence regulon, hpt and prfA, which upon activation by host signals induce increased fosfomycin influx into the bacterial cell. Consequently, in infection conditions, most *L. monocytogenes* isolates become susceptible to fosfomycin despite possessing a gene that confers high-level resistance to the drug. Our study establishes the molecular basis of an epistatic interaction between virulence and resistance genes controlling bacterial susceptibility to an antibiotic. The reported findings provide the rationale for the introduction of fosfomycin in the treatment of *Listeria* infections even though these bacteria are intrinsically resistant to the antibiotic in vitro.

6.2. LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS DE 2018

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., Pavio N, Villena I, Cerf O, Colin P, Dubois-Brissonnet F, Cuzzucoli D, Audiat-Perrin F, Thebault A, Laurent A, Arnich N, Kooh P, Sanaa M. 2018, CES « Evaluation des risques biologiques dans les aliments ». 2018. Avis de l'ANSES – Saisine N°2015-SA-0162 - Attribution des sources des maladies infectieuses d'origine alimentaire, Partie 2 : Analyse des données épidémiologiques. Anses, Maisons-Alfort. (<https://www.anses.fr/fr/system/files/BIORISK2015SA0162Ra-2.pdf>)

6.2.2. Publications internationales

Painset A, Björkman JT, Kiil K, Guillier L, Mariet JF, Félix B, Amar C, Rotariu O, Roussel S, Perez-Reche F, Brisse S, Moura A, Lecuit M, Forbes K, Strachan N, Grant K, Møller-Nielsen E, Dallman TJ. LiSEQ - whole-genome sequencing of a cross-sectional survey of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods and human clinical cases in Europe. Microb Genom. 2019 Feb; 5(2)

Moura A, Disson O, Lavina M, Thouvenot P, Huang L, Leclercq A, Fredriksson-Ahomaa M, Eshwar AK, Stephan R, Lecuit M. Atypical hemolytic *Listeria innocua* are virulent, albeit less than *Listeria monocytogenes*. Infect Immun. 2019 Jan 22. pii: IAI.00758-18

Leclercq A, Hardouin G, Lombard B. European and International validation of 15 main reference methods in the microbiology of the food chain. *Int J Food Microbiol*. 2019 Jan 2; 288:1-2.

Leclercq A, Moura A, Vales G, Tessaud-Rita N, Aguilhon C, Lecuit M. *Listeria thailandensis* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2019 Jan; 69(1):74-81

Scotti M, Han L, Alvarez S, Leclercq A, Moura A, Lecuit M, Vazquez-Boland J. Epistatic control of intrinsic resistance by virulence genes in *Listeria*. *PLoS Genet*. 2018 Sep 4; 14(9):e1007525. doi: 10.1371/journal.pgen.1007525. eCollection 2018 Sep. Erratum in: *PLoS Genet*. 2018 Oct 15; 14(10):e1007727.

Van Walle I, Björkman JT, Cormican M, Dallman T, Mossong J, Moura A, Pietzka A, Ruppitsch W, Takkinen J; European Listeria Wgs Typing Group (including Leclercq A, Lecuit M). Retrospective validation of whole genome sequencing-enhanced surveillance of listeriosis in Europe, 2010 to 2015. *Euro Surveill*. 2018 Aug; 23(33)

Charlier C, Poirée S, Delavaud C, Khoury G, Richaud C, Leclercq A, Hélénon O, Lecuit M; MONALISA Study Group. Imaging of Human Neurolisteriosis: A Prospective Study of 71 Cases. *Clin Infect Dis*. 2018 Oct 15; 67(9):1419-1426

Morgand M, Leclercq A, Maury MM, Bracq-Dieye H, Thouvenot P, Vales G, Lecuit M, Charlier C. *Listeria monocytogenes*-associated respiratory infections: a study of 38 consecutive cases. *Clin Microbiol Infect*. 2018 Dec; 24(12):1339.e1-1339.e5.

Núñez-Montero K, Leclercq A, Moura A, Vales G, Peraza J, Pizarro-Cerdá J, Lecuit M. *Listeria costaricensis* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2018 Mar;68(3):844-850

6.2.3. Communications nationales

Listériose cutanée : une série de 11 cas prospectifs. Pilmis M, Maury MM, Leclercq A, Moura A, Bracq-Dieye H, Thouvenot P, Vales G, Lecuit M, Charlier C. Poster. 38^{ième} Réunion Interdisciplinaire de chimiothérapie anti-infectieuse, Paris, Décembre 2018.

Neurolistériose. Charlier C. Présentation orale. 38^{ième} Réunion Interdisciplinaire de chimiothérapie anti-infectieuse, Paris, Décembre 2018.

6.2.4. Communications internationales

Multi-country outbreak of listeriosis due to *Listeria monocytogenes*, multi-locus sequence type 6, infections probably linked to frozen corn, European Union 2015–2018. Poster. Einöder-Moreno M, Rizzi V, Felix F, Rimhanen-Finne R, Leinonen E, Kanagarajah S, Jernberg C, Lecuit M, Leclercq A, Albert A, Schmid D, Pietzka A, Takkinen J & International Outbreak Investigation Team. ESCAIDE, Malte, (2018) Novembre 21-23.

Understanding how *Listeria* crosses host barriers and disseminates within the host. M. Lecuit, Présentation orale. Seminar Series, Institute of Microbiology and Immunology at National Yang-Ming University, Taipei, Taiwan (2018) Mai 9.

Understanding how *Listeria* crosses host barriers and disseminates within the host. M. Lecuit, Présentation orale. Microbial pathogenesis symposium, Chang Gung University, Taipei, Taiwan (2018) Mai 10.

Understanding how *Listeria* crosses host barriers and disseminates within the host. M. Lecuit, Présentation orale. Institut Pasteur International Network Asia-Pacific teaching course. Institut Pasteur, Shanghai, China (2018) Mai 14.

Infections in pregnancy. Charlier C. Présentation orale. 17th European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) - Summerschool, (2018) Paris, Juillet.

6.2.5. Conférences sur invitations

Genome-based surveillance of *Listeria monocytogenes*. M. Lecuit, Présentation orale. Séminaire "Epidémiologie moléculaire appliquée à la surveillance et au contrôle des maladies infectieuses". Santé Publique France, Saint Maurice, (2018) Mars.

Listeria monocytogenes, un envahisseur silencieux. M. Lecuit, Présentation orale. Séminaire du Cours "Immunité contre les microorganismes à développement intracellulaire", Chaire de Médecine Expérimentale, Collège de France, (2018) Juin.

Genome sequencing in infectious diseases. M. Lecuit, Présentation orale. European Human Genetics Conference, Milano, (2018) Juin 16.

Neurolisteriosis, M. Lecuit, Présentation orale. 8th Neuroscience of Critical illness and acute Central Nervous System Infection Meeting, Institut Pasteur, (2018) Juin 28-29.

Listeria invasion of host tissues and within-host dissemination. M. Lecuit, Présentation orale. Innovative approaches to the study of bacterial pathogens. International Center for Interdisciplinary Science, Qui Nhon, Vietnam, (2018) Septembre 16-21.

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 (2018) Décembre

Marc Lecuit est membre du comité scientifique de l'International Symposium on Problems of *Listeria* and Listeriosis (ISOPOL) dont le XXème symposium aura lieu du 24 au 27 Octobre 2019 à Toronto (Canada).

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 DGAL 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* (appartenant au LNRI) 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* en 2017 et ayant abouti en 2018 :

- au second rapport ‘Attribution des sources des maladies infectieuses d’origine alimentaire – Parti 2 : Analyse des données épidémiologiques (Saisine 2015-SA-0162) disponibles à l’adresse suivante <https://www.anses.fr/fr/system/files/BIORISK2015SA0162Ra-2.pdf> ;

- à la publication: *Mughini-Gras L, Kooh P, Augustin JC, David J, Fravallo P, Guillier L, Jourdan-Da-Silva N, Thébault A, Sanaa M, Watier L; Anses Working Group on Source Attribution of Foodborne Diseases (dont A. Leclercq). Source Attribution of Foodborne Diseases: Potentialities, Hurdles, and Future Expectations. Front Microbiol. 2018 Sep 3; 9: 1983.*

A. Leclercq est membre du comité de thèse d’une doctorante de l’École Doctorale ABIÉS (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).

Le CNRL a également participé avec le LNRI et l’EURLLm (ANSES) à l’étude LiSEQ (*Listeria* SEQuencing):

*Painset A, Björkman JT, Kiil K, Guillier L, Mariet JF, Félix B, Amar C, Rotariu O, Roussel S, Perez-Reche F, Brisse S, Moura A, Lecuit M, Forbes K, Strachan N, Grant K, Møller-Nielsen E, Dallman TJ. LiSEQ - whole-genome sequencing of a cross-sectional survey of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods and human clinical cases in Europe. Microb Genom. 2019 Feb; 5(2).*

We present the LiSEQ (*Listeria* SEQuencing) project, funded by the European Food Safety Agency (EFSA) to compare *Listeria monocytogenes* isolates collected in the European Union from ready-to-eat foods, compartments along the food chain (e.g. food-producing animals, food-processing environments) and humans. In this article, we report the molecular characterization of a selection of this data set employing whole-genome sequencing analysis. We present an overview of the strain diversity observed in different sampled sources, and characterize the isolates based on their virulence and resistance profile. We integrate into our analysis the global *L. monocytogenes* genome collection described by Moura and colleagues in 2016 to assess the representativeness of the LiSEQ collection in the context of known *L. monocytogenes* strain diversity.

7.2. ECHANGES ENTRE LE CNR ET LE LNR

Le CNRL a communiqué des séquences génomiques au LNRI dans le cadre de la surveillance européenne mais n'a reçu ni souche ni séquence du LNRI.

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

8. PROGRAMME D'ACTIVITE POUR LES ANNEES 2019-2020

Outre la poursuite des activités de surveillance et d'expertise, le programme de travail du CNRL pour les années 2019-2020 est le suivant :

Activités d'expertise :

- Continuité des activités mises en place ;
- Veille technologique en vue d'améliorer de façon continue la qualité et la rapidité de la caractérisation et du typage moléculaire des souches ;
- Détection de la persistance de clones dans les environnements de production agro-alimentaires.

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

- Evaluation continue aux vues des données de la surveillance de la valeur du cut-off définissant les cas groupés par 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*.

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 de *Lm* ;
- Evaluation d'alternatives thérapeutiques dans le traitement de la neurolistériose ;
- Etude des mécanismes de résistances des *Lm*.

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, 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*.
2. Morgand M, Leclercq A, Maury MM, Bracq-Dieye H, Thouvenot P, Vales G, Lecuit M, Charlier C. 2018. *Listeria monocytogenes*-associated respiratory infections: a study of 38 consecutive cases. *Clin Microbiol Infect* 24:1339 e1-1339 e5.
3. Moura A, Disson O, Lavina M, Thouvenot P, Huang L, Leclercq A, Fredriksson-Ahomaa M, Eshwar AK, Stephan R, Lecuit M. 2019. Atypical Hemolytic *Listeria innocua* Isolates Are Virulent, albeit Less than *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* 87.
4. 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, Ravaut 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.
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. 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.
7. 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.
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. 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, Carbonnelle 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.
10. Cobo F, Borrego J, Rodriguez-Granger J, Puertas A, Sampedro A, Navarro-Mari JM. 2019. Detection of bacterial pathogens in sterile fluids with the FilmArray Meningitis/Encephalitis identification system. *Rev Esp Quimioter* 32:85-86.
11. Graf EH, Farquharson MV, Cardenas AM. 2017. Comparative evaluation of the FilmArray meningitis/encephalitis molecular panel in a pediatric population. *Diagn Microbiol Infect Dis* 87:92-94.
12. 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.
13. Soucek DK, Dumkow LE, VanLangen KM, Jameson AP. 2019. Cost Justification of the BioFire FilmArray Meningitis/Encephalitis Panel Versus Standard of Care for Diagnosing Meningitis in a Community Hospital. *J Pharm Pract* 32:36-40.
14. 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.

15. Leclercq A, Moura A, Vales G, Tessaud-Rita N, Aguilhon C, Lecuit M. 2019. *Listeria thailandensis* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 69:74-81.
16. Bastin B, Bird P, Crowley E, Benzinger MJ, Agin J, Goins D, Sohler D, Timke M, Awad M, Kostrzewa M. 2018. Confirmation and Identification of *Listeria monocytogenes*, *Listeria* spp. and Other Gram-Positive Organisms by the Bruker MALDI Biotyper Method: Collaborative Study, First Action 2017.10. *J AOAC Int* 101:1610-1622.
17. 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.
18. 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.
19. 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://ecdceuropaeu/en/publications/Publications/zoonoses-trends-sources-EU-summary-report-2014pdf>.
20. 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.
21. Mook P, O'Brien SJ, Gillespie IA. 2011. Concurrent conditions and human listeriosis, England, 1999-2009. *Emerg Infect Dis* 17:38-43.
22. 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.
23. 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.
24. 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.
25. 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.
26. Hof H, Nichterlein T, Kretschmar M. 1997. Management of listeriosis. *Clin Microbiol Rev* 10:345-57.
27. 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.
28. 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.
29. Jacquet C, Doumith M, Gordon JJ, 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.
30. 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.
31. 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.

32. 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.
33. 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.
34. 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.
35. 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.
36. 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.
37. 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.
38. 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.
39. 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.
40. 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.
41. Hof H. 2013. Chemotherapy of *Listeria* infections. *GMS Infectious diseases* 1:1-10.
42. Charlier-Woerther C, Leclercq A, Lortholary O, Lecuit M. 2009. [Listeriosis, a rare but severe foodborne infection]. *Rev Prat* 59:905-11.
43. 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,
44. 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 Bebdom Hors série*. 9 mai 2012:41-45.
45. 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.
46. 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.
47. Goulet V, King LA, Vaillant V, de Valk H. 2013. What is the incubation period for listeriosis? *BMC Infect Dis* 13:11.
48. 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.
49. Leclercq A, Charlier C, Lecuit M. Global burden of listeriosis: the tip of the iceberg. *Lancet Infect Dis* 14:1027-8.
50. 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.

51. 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,
52. 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.
53. Van Walle I, Bjorkman JT, Cormican M, Dallman T, Mossong J, Moura A, Pietzka A, Ruppitsch W, Takkinen J, European Listeria Wgs Typing G. 2018. Retrospective validation of whole genome sequencing-enhanced surveillance of listeriosis in Europe, 2010 to 2015. *Euro Surveill* 23.
54. Painset A, Bjorkman JT, Kiil K, Guillier L, Mariet JF, Felix B, Amar C, Rotariu O, Roussel S, Perez-Reche F, Brisse S, Moura A, Lecuit M, Forbes K, Strachan N, Grant K, Moller-Nielsen E, Dallman TJ. 2019. LiSEQ - whole-genome sequencing of a cross-sectional survey of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods and human clinical cases in Europe. *Microb Genom* 5.
55. Scotti M, Han L, Alvarez S, Leclercq A, Moura A, Lecuit M, Vazquez-Boland J. 2018. Epistatic control of intrinsic resistance by virulence genes in *Listeria*. *PLoS Genet* 14:e1007525.
56. Mughini-Gras L, Kooh P, Augustin JC, David J, Fravallo P, Guillier L, Jourdan-Da-Silva N, Thebault A, Sanaa M, Watier L, Anses Working Group on Source Attribution of Foodborne D. 2018. Source Attribution of Foodborne Diseases: Potentialities, Hurdles, and Future Expectations. *Front Microbiol* 9:1983.
57. 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.
58. Haase JK, Murphy RA, Choudhury KR, Achtman M. Revival of Seeliger's historical 'Special *Listeria* Culture Collection'. *Environ Microbiol* 13:3163-71.
59. 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.
60. Chenal-Francois 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.
61. Leclercq A, Le Monnier A. 2018. *Listeria monocytogenes*, p 569-574. In *Microbiologie SFd (ed), Référentiel en microbiologie médicale (REMIC)*, 6 ed, vol 6.2, Paris, France.
62. 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.
63. Chenal-Francois 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.
64. 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.
65. 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.
66. CLSI. 2018. M100. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 8th ed, Wayne, PA
67. Anonyme. 2012. European Manual of Clinical microbiology, 1st ed. SFM & ESCMID, Paris,France.
68. 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.
69. Leitner E, Hoenigl M, Wagner B, Krause R, Feierl G, Grisold AJ. 2016. Performance of the FilmArray Blood culture identification panel in positive blood culture bottles and cerebrospinal fluid for the diagnosis of sepsis and meningitis. *GMS Infect Dis* 4:Doc06.
70. 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 *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 9.

Tableau 9. 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
DIAKITE Andrée	Secrétaire/Assistante	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.

Le CNRL possède 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 (<https://dpi.sante.gouv.fr>) auprès du Ministère des solidarités et de la santé (Annexe C) et leur déclaration de liens d'intérêt à l'Institut Pasteur.

Les techniciens sont déclarés à l'ARS Île-de-France dans le cadre de leur activité au CNRL. L'assistante 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.

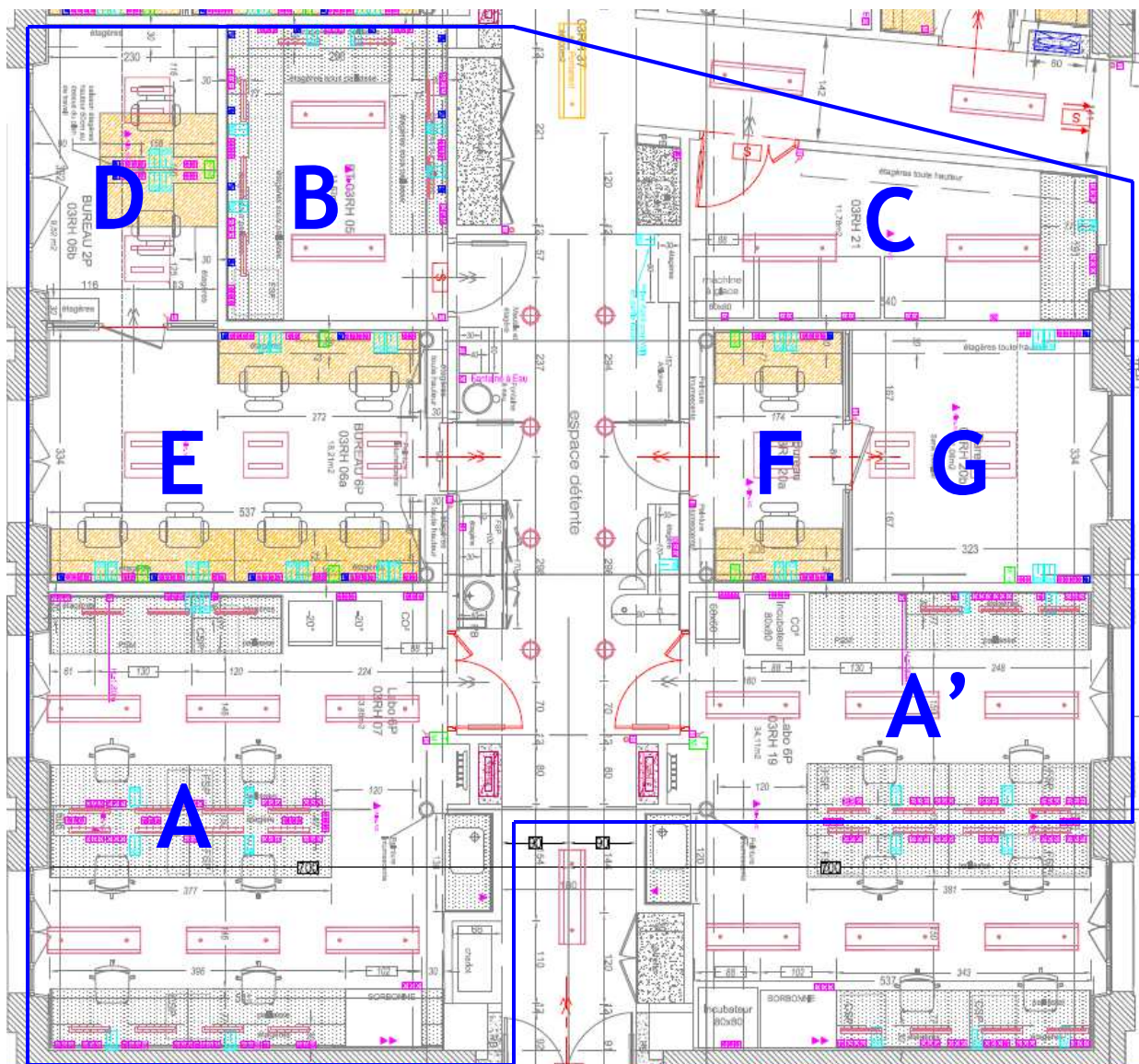
A.2. LOCAUX

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 2018, l'Institut Pasteur a financé l'acquisition d'équipements de sécurité (un poste de sécurité microbiologique PSM II) et de stockage (1 congélateur -80°C pour stocker les souches du CNR) dans le cadre du cahier des charges SPF du CNR, 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,
- 2 postes de sécurité microbiologique PSM II,
- 2 étuves,
- 3 bains thermostatés humides et 1 bain thermostaté à sec,
- 5 réfrigérateurs,
- 2 congélateurs,
- 2 congélateurs -80°C,
- 3 centrifugeuses dont une pour les plaques,
- 1 lecteur automatique d'antibiogrammes Intersciences intégrant les référentiels CA-SFM, EUCAST et CLSI,
- 3 thermocycleurs en point final,
- 2 générateurs et cuves d'électrophorèse,
- 1 fax et 1 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 2018, le CNRL n'a pas reçu de demandes de distribution de sérums et n'a pas communiqué de souches d'alertes produits au LNRI. Le CNRL échange maintenant les séquences génomiques qu'ils possèdent comme lors des investigations d'épidémies comme décrit précédemment. Par contre, il a distribué des souches à l'Institut für Medizinische Mikrobiologie (Giessen, Allemagne) dans le cadre d'une étude sur les lignées de *L. monocytogenes*.

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

Le CNRL dispose des souches types complètement caractérisées des 20 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*, *L. goaensis*, *L. thailandensis*), 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 deux congélateurs 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 111 616 souches à la fin de l'année 2018. 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 70 059 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 deux congélateurs 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* (57, 58). 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 : https://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 (et des souches *Listeria* de propagation) 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 CNRL 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 CNRL est donc préservée).

L'accès au matériel biologique collecté dans le cadre de l'activité du CNRL 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 CNRL 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 CNRL.

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 épidémioclinico-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, Récépissé 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 de développement par la société AGILAB pour le LREMS dont fait partie le CNRL afin d'intégrer le suivi en temps réel de l'échantillon par le laboratoire correspondant, une meilleure interaction avec les partenaires (SPF, DGAI, etc.) du CNRL et la récupération de ses résultats sous une forme dématérialisée via une interface sécurisée web. Ce développement a permis de redéfinir les processus dans le CNR et les optimiser au moyen de ce nouveau LIMS.

Base de spectres de masses de souches de *Listeria* : le CNRL a constitué depuis 2016 une base de données de plus de 6000 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) (59, 60), 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://bigsdbs.pasteur.fr/Listeria/Listeria.html>). MM. 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*. En 2018, 221 données de 10 pays (République tchèque, USA, Chili, Slovaquie, Chine, Finlande, Norvège, Brésil, Italie, Russie) ont été curées par le CNRL.

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 2018, la base contenait 32 963 génomes publics ou privés de *Listeria*. Une mise à jour de BIGSdb a été réalisée en 2018 qui permettra après paramétrage en 2019 une consultation publique ou privée de la base de données *Listeria* ainsi que l'automatisation de la détermination des types cgMLST. 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. Fin 2017, le CNRL en accord avec les pays dépositaires d'une urgente inquiry (UI) de l'ECDC dépose la séquence de la souche référente de l'UI dans BIGSdb avec son type et profil cgMLST pour que les utilisateurs de BIGSdb puissent utiliser cette information à des fins de comparaison. En 2018, le CNRL a curé 2200 génomes de *L. monocytogenes* de 8 pays (Afrique du Sud, Espagne, Brésil, Pologne, Taiwan, Brésil, Australie, Irlande). De même, le personnel du CNRL a participé, en tant que curateurs, à l'Institut Pasteur au cours international '*Bacterial strain nomenclature applied to international epidemiological surveillance : A theoretical and Hands-on Course*' du 29-30 Octobre 2018 de formation des curateurs des différentes régions du monde à BIGSdb nouvelle version.

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 17718 profils de macrorestriction et 11332 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 2018, 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 490 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.

Le projet d'accréditation ISO 15189 de l'Institut Pasteur est une démarche dynamique pilotée par :

- la Direction aux Ressources Techniques et à l'Environnement et son Service Qualité, Environnement et Développement Durable (QEDD) qui apporte ses ressources et son expertise dans l'accompagnement du projet d'accréditation ISO 15189 du LREMS (certifié ISO 9001 v 2015)
- la Direction des Affaires médicales et de Santé Publique ;
- et la Coordination des Centres Nationaux de Référence de l'Institut Pasteur.

Les services supports de l'Institut Pasteur participent également à la démarche d'accréditation du LREMS en apportant les ressources nécessaires au bon déroulement des activités.

Suite à l'évaluation de Janvier 2018, les 14 CNR de l'Institut Pasteur et la CIBU du LREMS sont accrédités COFRAC selon la norme ISO 15189 version 2012 sous le n° 8-2588. L'annexe d'accréditation est disponible sur le site du COFRAC www.cofrac.fr.

Liste des faits marquants survenus en 2018-2019 :

1. Evaluation de surveillance S5 et/ou d'extension COFRAC LRE-MS du 16 au 20 Janvier 2018 : Le rapport d'évaluation indique que les évaluateurs accordent leur confiance au LRE-MS dont le CNR *Listeria*.
2. Revue qualité LRE-MS du CNR *Listeria* : 23 Mars 2018
3. Revue de direction du LRE-MS : 16 Mai 2018
4. Audits internes technique et qualité : 19 Septembre 2018 - 05 octobre 2018
5. Revue qualité LRE-MS du CNR *Listeria* : 10 Avril 2019
6. Audit de surveillance S6 et/ou d'extension COFRAC LRE-MS du 15 au 19 Avril 2019

Le génotypage 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 2018, le CNRL a envoyé une enquête de satisfaction clients à 523 laboratoires (70% de LABM et 30% de laboratoires de Microbiologie Alimentaire) avec un taux de réponses de 18%. Les questions posées et les notes obtenues sont listées dans le tableau 10. D'après les réponses obtenues 46% des laboratoires font appel au CNRL pour son support technique et ses conseils, 31% pour la qualité du service et pour 43% d'entre eux, il s'agit d'un choix imposé. Les principaux axes d'amélioration suggérés sont : des résultats disponibles par voie dématérialisée via internet. La prochaine enquête satisfaction client aura lieu fin 2020.

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 11.

Tableau 10. Résultats de l'enquête satisfaction client 2018

Questions Posées	Note moyenne sur 4 en 2014	Note moyenne sur 4 en 2016	Note moyenne sur 4 en 2018
1. Activités analytiques			
1.1 - Méthodes réalisées	3.4	3.6	3.7
1.2 – Conditions générales analytiques sur notre site Web	3.2	3.4	3.6
1.3 - Contenu du compte-rendu d'analyses	3.5	3.4	3.5
1.4 - Délai de rendu de résultats	3.0	3.0	3.0
2. Relations			
2.1 - Accueil téléphonique	3.4	3.3	3.4
2.2 - Disponibilité des interlocuteurs	3.4	3.3	3.3
2.3 - Qualité des réponses données	3.5	3.5	3.5
2.4 - Traitement de vos réclamations	3.4	3.3	3.3
3. Site Web			
3.1 - Présentation	3.3	3.2	3.3
3.2 - Intérêt des informations données	3.3	3.3	3.2
3.3 - Convivialité du site web	3.1	3.2	3.2
4. Compte-rendu diffusé			
4.1 - Respect des délais de rendu des résultats	3.1	3.1	3.2
4.2 – Présentation et clarté du compte rendu	3.4	3.3	3.4
4.3 – Les moyens de transmission des résultats	3.0	3.1	3.0
4.4. – Interprétations des résultats et commentaires oraux des responsables du CNR	3.4	3.4	3.5
4.5 – Conformité des analyses réalisées avec votre demande	3.5	3.4	3.6
5. La présentation générale			
5.1. – Etes-vous satisfait de la prestation de conseil assurée par les Responsables ?	3.5	3.4	3.5

Tableau 11. Liste des méthodes soumises à l'accréditation et volume d'activité annuelle (%)

Méthodes analytiques	% Activité	Année d'accréditation
Génosérotypage de <i>Listeria monocytogenes</i>	100%	2015

Essais d'intercomparaison (EQA)

En 2018, le CNRL a réalisé un 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 12.

Tableau 12. Résultats du CNRL à l’EQA de l’EURL puis de l’ECDC de 2012 à 2018

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)	EQA N°6 ECDC (Octobre 2018)
Nombre de laboratoires participants	33	18	18	18	18	2	5	18	18
Nombre de souches testées	10	10	10	11	11	15	36	11	11
Identification <i>Lm</i> par phénotypie	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	ND	ND	ND
Identification <i>Lm</i> par Maldi-Tof MS	ND	ND	ND	ND	ND	Conforme	Conforme	ND	ND
Scores sérotypage classique	ND	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	ND	ND	ND	ND
Scores sérotypage moléculaire	ND	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	ND	Conforme	Conforme
Qualité Gel PFGE	<i>Ascl</i>	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	ND	ND	ND
	<i>Apal</i>								
Analyse gel PFGE Bionumerics	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	ND	ND	ND	ND

Hygiène/Sécurité

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

A.7. REGLEMENT GENERAL SUR LA PROTECTION DES DONNEES (RGPD)

Dans le cadre de la mise en œuvre du nouveau Règlement Général sur la Protection des Données (RGPD) entré en application le 25 mai 2018, l’Institut Pasteur a institué un programme permanent de conformité au RGPD.

Il a dans cadre de celui-ci :

- désigné un délégué à la protection des données (DPO) depuis juillet 2018 ;
- établi un registre des opérations de traitement pour lesquelles il agit d’une part en qualité de responsable du traitement et d’autre part en qualité de sous-traitant ;
- souscrit auprès de la CNIL un engagement de conformité aux méthodologies de référence MR-01 – MR-02 et MR-03 ;
- pris des initiatives de sensibilisation de ses personnels à la protection des données.

Le LREMS, dont le CNRL, s’est mis en conformité par rapport à la réglementation RGPD.

Le correspondant communication est également correspondant RGPD (Règlement général sur la protection des données) du CNRL est A. Diakite.

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). 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 (8, 61). 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 (62) et amendée en 2011 (27). 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 CNRL 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 gélosé 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 (38, 63).

- **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 troncation 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. En complément

de l'analyse cgMLST, le géosérotypage *in silico*, le virulome, le résistome sont réalisés pour chaque séquence analysée.

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 (31). Cette méthode permet de positionner rapidement les souches par rapport aux clones MLST majeurs et d'ainsi prédire le potentiel infectieux des souches (30).

- **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. En 2018, aucune souche de *L. monocytogenes* viables n'a été isolée des 3 selles expertisées par le CNRL dans le cadre de la transplantation fécale ou de demande de cliniciens.

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, 6eme édition, 2018, chapitre *Listeria* (61) 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) 2018 (61)).

- *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 géloses 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, 64).

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, triméthoprime-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 v9.0 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 (65, 66). Les concentrations minimales inhibitrices et les diamètres sont en cours d'établissement.

A la demande de nombreux laboratoires correspondants, nous proposons le tableau 13 suivant d'interprétation des résultats d'antibiogrammes.

Tableau 13. 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 9.0 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 - ≤ 16	≥ 16
Benzylpenicilline**	≤ 1	-	> 1
Gentamicine*	≤ 4	8	≥ 16
Ciprofloxacine*	≤ 1	2	≥ 4
Chloramphénicol*	≤ 8	16	≥ 32
Streptomycine*	≤ 8	> 8 - ≤ 16	> 16
Méropénème**	≤ 0.25	-	> 0.25
Vancomycine*	≤ 4	8-16	≥ 32
Erythromycine**	≤ 1	-	> 1
Tétracycline*	≤ 4	8	≥ 16
Triméthoprime +Sulfaméthoxazole**	≤ 0.06 <i>(exprimé pour la concentration en Triméthoprime)</i>	-	> 0.06 <i>(exprimé pour la concentration en Triméthoprime)</i>

- *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 64) n'est pas pris en compte dans la surveillance nationale (67) 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 (68). 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.

Suite à la demande de la cellule interministérielle *Listeria* en 2017 sur le questionnement des 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 CNRL a interrogé le réseau de biologistes français R2M auquel il participe 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) (10-14) et
- pour les PCR syndromiques sur sang avec le kit Filmarray Blood Culture Identification (BCID, bioMérieux, Marcy l'Etoile) (69).

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/fr/Health_standards/tahm/2.09.06_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 (Nouvelle version en 2018), 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) (70) 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) (16).