

## Une base de données de typage partagée pour la surveillance de *Listeria monocytogenes*

Benjamin FELIX (1), Damien MICHELON (1), Charleyne PRENOM (2),  
Emeline ROBIEU (2), Sophie ROUSSEL (1), Carole FEURER (2)

(1) ANSES, Laboratoire de sécurité des aliments, France 14 rue Pierre et Marie Curie, 94 700 Maisons Alfort, France

(2) IFIP-Institut du Porc, 7 avenue du Général de Gaulle, 94 700 Maisons-Alfort, France  
carole.feurer@ifip.asso.fr

*Listeria monocytogenes* (Lm) est une bactérie ubiquitaire responsable d'une infection rare mais grave : la listériose. Transmise par la consommation d'aliments contaminés, la listériose s'avère mortelle dans 20 à 30 % des cas. Elle touche principalement les personnes faibles immunitairement et plus rarement des personnes en bonne santé. L'infection dépend de la dose et de la virulence du groupe génétique de la souche ingérée. De ce fait, la surveillance génétique des souches isolées de la chaîne alimentaire et de l'environnement de production est essentielle. Dans le cadre de l'Unité mixte technologique (UMT) Armada, l'Ifip et l'Anses ont travaillé depuis 4 ans à l'harmonisation de leurs protocoles de typage PFGE. Le besoin d'échanger leurs données de typage a abouti à la création d'une base de données nationale de typage partagée. L'objectif de cette base est de mettre en commun les données épidémiologiques et génétiques des souches détenues par les deux instituts. A terme, elle sera partagée entre quatre instituts techniques français ainsi que les laboratoires de l'Anses impliqués dans la surveillance de Lm. Elle contient actuellement 1200 souches typées par PFGE, partageant 256 profils combinés Apal/Ascl. Cet outil permettra une surveillance accrue des souches circulant dans la filière porcine.

### A molecular *Listeria monocytogenes* database to centralize and share typing data

*Listeria monocytogenes* (Lm) is an ubiquitous bacterium that causes a severe illness. The listeriosis is contracted through contaminated food consumption with a case fatality rate of 20-30%. The incidence is higher for risk groups having a weak immunity and lower for healthy people. The infection depends on the dose and the genetic group of the strain ingested. Lm needs to be extensively surveyed in food production. This is the reason why a molecular surveillance is applied. For 4 years, Ifip and Anses have been working together in the frame of the Armada joint technological unit, a national collaborative project. It enabled the two partners to harmonize their typing method according to standard operating procedures for PFGE. The need for exchanging typing data recently resulted in the creation of a joint national molecular typing database. Its objective is to share epidemiological and genetic data related to strains owned by both Anses and Ifip. Ultimately, this database will be shared between four other French technical institutes and Anses units involved in the national surveillance of Lm. This database contains 1200 strains all typed by PFGE, sharing 256 combined Apal-Ascl PFGE pulsotypes. This key tool may enable an improved surveillance of strains circulating throughout the pig and pork sector.

**Mots clés :** *Listeria monocytogenes*, base de données de typage, surveillance, filière porcine

Keywords: *Listeria monocytogenes*, molecular database, surveillance, pig and pork sector

## Introduction

*Listeria monocytogenes* (*Lm*) est une bactérie saprophyte et ubiquitaire pouvant être responsable chez l'Homme d'une infection d'origine alimentaire : la listériose. La listériose est une infection rare (5,7 cas par million d'habitants en 2014; InVS) mais grave.

Elle touche principalement les personnes faibles immunitairement (les personnes âgées, immunodéprimées ou les femmes enceintes) et plus rarement des personnes en bonne santé. L'infection dépend de la dose et de la virulence du groupe génétique de la souche ingérée.

La contamination des aliments peut survenir à partir de matières premières animales ou végétales mais plus particulièrement à partir de l'environnement des sites de production dans lequel des souches de *Lm* sont capables de survivre, de persister et de s'implanter.

La filière porcine a été fortement impactée ces dernières décennies par plusieurs crises sanitaires liées à *Lm* (Tourdjman *et al.*, 2014). Il a été démontré que la contamination des sites de production et la persistance de certaines souches en atelier de transformation sont souvent à l'origine de ce problème de santé publique. Pour protéger les consommateurs, la réglementation Européenne (CE N°2073/2005) impose l'absence de *Lm* dans 25 g d'aliments pour tous les aliments à la sortie de la chaîne de production, sauf pour ceux dont l'industriel a démontré qu'ils ne permettaient pas la croissance de la bactérie au-dessus de 100 CFU/g jusqu'à la date limite de consommation. Ce règlement implique la mise en place de plans de contrôles microbiologiques drastiques par les industriels et dans de certains cas, des rappels de produits.

Dans ce contexte, les méthodes de typage moléculaires peuvent aider à (i) identifier les sources de contamination à chaque étape de la chaîne alimentaire et (ii) définir le groupe génétique des souches isolées. Pour la surveillance de *Lm* en France, le pulsotypage (PFGE) reste actuellement la méthode de référence internationale pour le typage moléculaire des souches cliniques et alimentaires (Tourdjman *et al.*, 2014). L'équipe « *Listeria* » de l'Unité SEL (*Salmonella-E.coli-Listeria*) du Laboratoire de Sécurité des Aliments de l'Anses de Maisons-Alfort figure parmi les unités supports pour les activités de Laboratoire de Référence de l'Union Européenne (LRUE) et Laboratoire National de Référence (LNR) pour *Lm*. L'Ifip, l'Institut de la filière porcine, assure depuis plus de 15 ans la surveillance de *Listeria monocytogenes* de l'élevage jusqu'aux produits transformés.

Dans le cadre de l'Unité Mixte Technologique « UMT Armada », l'Ifip et l'Unité SEL de l'Anses ont mis en place une base de données moléculaires multi filières, contenant à la fois les informations épidémiologiques détaillées et les données de typage (PFGE, MLST, sérotypes) de souches provenant essentiellement de l'environnement d'ateliers de transformation, de matières premières et de produits finis, isolées en France depuis une dizaine d'années.

L'objectif d'une telle base est de pouvoir échanger et mutualiser des données issues de diverses filières alimentaires. A partir de cette base partagée, nous avons développé une base spécifique à la filière porcine afin d'aider à la surveillance de *Lm* dans cette filière et d'améliorer nos connaissances sur la diversité génétique des souches de *Lm* isolées.

## Outils et méthodes

### Le contexte d'isolement des souches

L'unité SEL de l'Anses reçoit des souches de *Lm* d'origine non humaine transmises (i) de façon volontaire par les laboratoires départementaux et les laboratoires d'analyses agroalimentaires, (ii) dans le cadre des plans de surveillance et des plans d'autocontrôles mis en place par la DGAL, (iii) lors d'alertes alimentaires, en tant que LNR et (iv) dans le cadre de projets de recherche. L'Ifip quant à lui collecte les souches de *Lm* isolées des autocontrôles réalisés par les entreprises (salaisons, charcuteries, produits traiteur) et dans le cadre de projets de recherche réalisés pour la filière porcine.

### La caractérisation des souches

Lors de la surveillance exercée à l'Anses ou à l'Ifip, la caractérisation des souches de *Lm* reçues suit le même processus : les souches sont d'abord sérotypées et classées selon les sérogroupes IIa (1/2a, 3a), IIb (1/2b, 3b, 7), IIc (1/2c, 3c), IVb (4b, 4ab, 4d, 4e) ou IVa (4a, 4c) (Doumith *et al.*, 2004, Kerouanton *et al.* 2010), puis typées par PFGE (obtention du profil moléculaire).

Dans le cadre de l'UMT Armada, l'Ifip et l'Anses ont harmonisé leurs méthodes de typage et d'interprétation des profils PFGE selon des protocoles standardisés (Michelon *et al.* 2015). Pour chaque souche, deux profils moléculaires sont générés, l'un obtenu avec l'enzyme *ApaI* et l'autre avec l'enzyme *AscI*. Cela permet une discrimination optimale entre les isolats.

### Les bases de données individuelles disponibles

Toutes les informations épidémiologiques et de typage des souches collectées par l'Ifip et l'Anses sont indépendamment intégrées dans leurs bases de données respectives.

### La base de données de l'Anses

Elle comporte 3500 isolats d'origine non humaine dont 474 sont issus de la filière porc. Tous les isolats sont typés par PFGE et leurs profils centralisés dans la base de données du LNR, gérée sous BioNumerics (Applied Maths, Belgique, version 7.5). Le LRUE est étroitement impliqué dans le développement de la base de typage moléculaire européenne de l'EFSA (Félix *et al.*, 2014). La mise en place

de cette base nécessite la mutualisation de l'ensemble des données de typage obtenues par tous les LNR Européens afin d'améliorer la traçabilité des souches de *Lm* en circulation en Europe.

### La base de données de l'Ifip

L'Ifip, dans le cadre de sa mission de surveillance épidémiologique des contaminants et d'hygiène de production pour les industries agro-alimentaires, gère une base de données professionnelle pour les souches de *Lm* isolées de la filière porcine mais également d'autres filières animales. Les profils PFGE sont analysés sous BioNumerics (Applied Maths, Belgique, version 6.6). La base contient actuellement plus de 600 profils en grande partie issus de la filière porcine.

### La base de données partagée

La base de données partagée est également gérée sous le logiciel BioNumerics (version 7.5) via un serveur web (BioNumerics (BN) Server Web Edition, version 6.1, Applied Maths, Belgique) qui permet l'échange des données entre les différents utilisateurs. Les différentes versions du logiciel détenues par les utilisateurs sont compatibles. L'Anses est administrateur de la base de données *Lm* de l'UMT Armada et est responsable de la curation des profils

PFGE soumis. Elle est également chargée de la conservation à long terme des données soumises.

Les utilisateurs sont les Instituts Techniques et laboratoires Anses ayant été au préalable (i) formés à la PFGE selon des protocoles standardisés (Félix *et al.*, 2012) et (ii) qualifiés lors de leur participation aux essais inter laboratoires d'aptitude (EILAs) que l'Ifip organise tous les deux ans.

Par ailleurs, l'Ifip et l'Anses ont mis en place une charte d'utilisation de la base de données *Lm* de l'UMT Armada, dont les utilisateurs sont signataires. Cette charte décrit les conditions d'alimentation de la base de données par l'utilisateur et les conditions de mise à disposition des données de la base par l'Anses. La propriété et la confidentialité des données y sont également précisées.

### Fonctionnement de la base de données partagée

#### Description de la base

La base de données de l'UMT Armada permet le partage de profils moléculaires de souches de *Lm* associés à leurs données épidémiologiques (Figure 1). Les descriptions épidémiologiques sont faites dans un langage standard de partage propre à la base. Ce langage est par la suite transcrit de façon automatique dans le langage standard Foodex 2

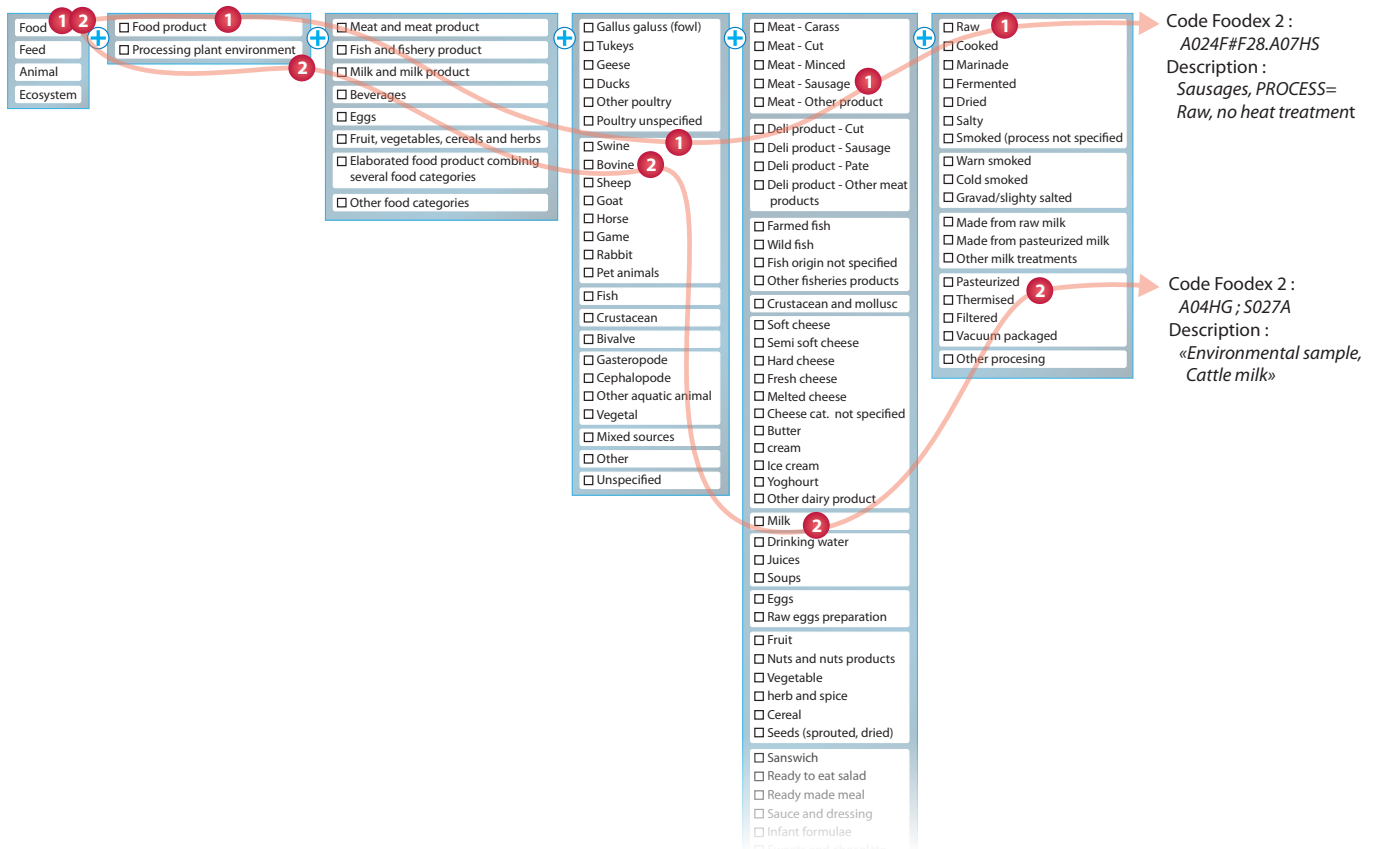


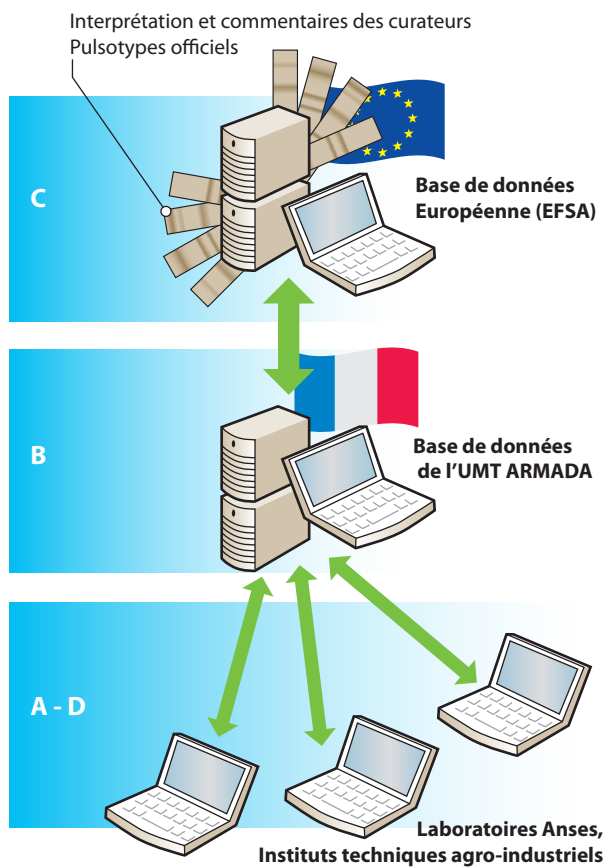
Figure 1 : Description standard des aliments utilisée dans la base de données de l'UMT Armada et correspondance automatique avec le schéma épidémiologique Foodex 2 (EFSA 2011)

utilisé par l'EFSA (EFSA 2011). Les données proviennent des soumissions faites par les utilisateurs. La qualité des données est assurée par une curation réalisée au niveau Européen (Figure 2). Elle permet aux utilisateurs d'avoir accès aux données de façon illimitée tout en conservant anonyme l'appartenance des souches et leur origine géographique d'isolement, comme décrit précédemment Felix *et al.* (2014) (2015). La connexion de la base de données de l'UMT Armada à la base de données EFSA se fait sous BioNumerics version 7.5 via une connexion utilisateur (EFSA 2014). La curation est réalisée au niveau européen puis retransmise au niveau national via un système de synchronisation en cascade avec la base de l'UMT Armada et la base de données de ses utilisateurs.

Actuellement quatre Instituts techniques agro-industriels (Ifip, Aerial, Actalia La Roche sur Foron et ADRIA développement) et deux laboratoires Anses (unité SEL du LSAL et unité Hygiène qualité des produits avicoles et porcins (HQPAP) du laboratoire de Ploufragan) peuvent utiliser la base de données de l'UMT Armada.

La base de données de l'UMT Armada rassemble 1602 profils moléculaires (PFGE) combinés générés avec les enzymes de restriction *AscI* et *ApaI*. Parmi ces profils, 1136 ont été validés par le processus de curation. 319 sont en cours de curation. Ces profils sont regroupés dans 538 pulsotypes combinés distincts par au moins une bande de différence suivant les recommandations des standards internationaux (Barrett *et al.* 2006). Le typage par MLST a été réalisé pour 167 souches dans 167 pulsotypes combinés différents et mis à la disponibilité des utilisateurs dans deux champs de la base de données (Séquence type et Complexe clonal). Les souches se répartissent par origine alimentaire : produits carnés (524 souches dont 241 isolées de produits à base de porc), produits laitiers (189 souches), produits de la pêche (179 souches), produits composés (213 souches), végétaux (59 souches), prélèvements animaux et environnementaux non-alimentaires (45 souches).

Au sein de la base de l'UMT Armada nous avons développé un sous ensemble spécifique à la filière porcine française qui comprend environ 560 souches, provenant des élevages, des ateliers d'abattage/découpe et de transformation et de produits finis. Ce sous ensemble rassemble les profils combinés des souches de trois laboratoires, Ifip, l'Unité SEL du LSAL et l'unité HQPAP du laboratoire de Ploufragan (Boscher *et al.* 2012, Denis *et al.* 2011).



**Figure 2 :** Flux des informations assurant (A) la soumission des profils moléculaires, (B) le partage des données entre les utilisateurs de la base de données de l'UMT Armada, (C) la curation des données au niveau européen et (D) le retour des information de curation aux utilisateurs

## Gouvernance de la base

Le comité de pilotage de la base *Lm* de l'UMT Armada est constitué par un représentant de chaque partenaire de l'UMT (Anses, Ifip, Actalia La Roche sur Foron). Il a pour rôle de donner des orientations et de faire des recommandations aux utilisateurs concernant leurs échanges d'informations, et notamment de :

- garantir la robustesse de la base de données
- gérer l'ajout de nouvelles fonctionnalités à la base de données, telles que la mise à disposition de données de typage par Multi-locus sequence typing (MLST) ou le séquençage de génomes entiers.

## Charte d'utilisation

La soumission des profils moléculaires s'effectue sur la base du volontariat après accord entre l'entreprise d'où provient la/les souche(s) et le laboratoire ayant réalisé le typage. Le laboratoire utilisateur doit enregistrer simultanément les profils *ApaI* et *AscI*. Le sérotype ainsi que toutes les informations épidémiologiques liées à la/les souche(s) doivent être complétés avant la soumission.

L'Anses analyse les profils PFGE soumis et émet un rapport de curation qui indique la date de soumission du profil, la date d'analyse par le curateur et l'acceptation ou le rejet du profil. Lorsque le profil est accepté, il intègre la base de données et un numéro lui est attribué. L'utilisateur a

également connaissance de la fréquence d'isolement de ce profil dans la base de données. Lorsque le profil est rejeté, des recommandations sont émises conjointement à une justification du rejet. Le rapport de curation est envoyé 7 jours après soumission des profils par l'utilisateur.

Toutes les données saisies, validées et intégrées par le curateur dans la base de données *Lm* de l'UMT Armada font définitivement partie de celle-ci et donc de la base de données de l'EFSA.

### Les possibilités pour les utilisateurs

L'utilisateur peut consulter les données de typage et les informations épidémiologiques des souches enregistrées dans la base de données *Lm* de l'UMT Armada sans pour autant soumettre ses profils PFGE. Il peut comparer ses profils à ceux présents dans la base et/ou rechercher des profils PFGE de souches correspondant à des critères épidémiologiques précis (sérotypage, filière d'isolement etc...). Il a également la possibilité de soumettre définitivement les profils PFGE qu'il souhaite comparer. L'enregistrement des profils est indispensable à la construction et à l'expansion de la base de données *Lm* de l'UMT Armada.

L'utilisateur a un accès illimité à la base de données *Lm* de l'UMT Armada pour l'enregistrement et la consultation automatique des profils.

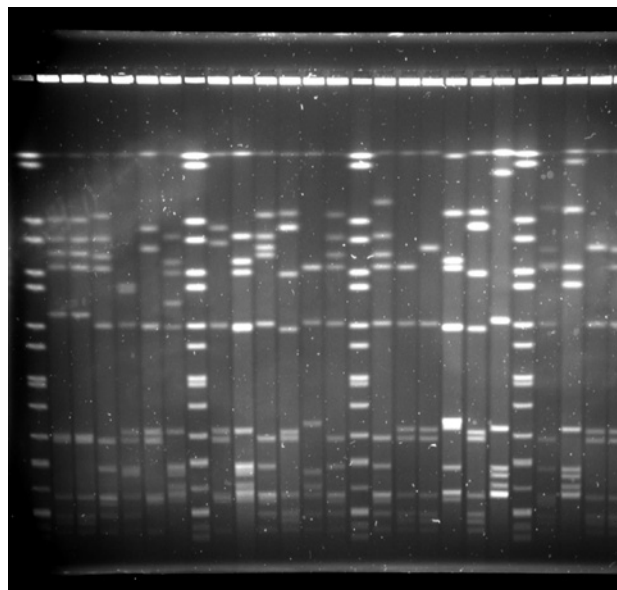
### Propriété et confidentialité des données

L'enregistrement des données dans la base de données *Lm* de l'UMT Armada n'entraîne pas le transfert de propriétés des données. Ainsi, les utilisateurs restent propriétaires des données qu'ils soumettent et sont libres de les publier. L'Anses ne peut pas transmettre la base de données *Lm* de l'UMT Armada à un autre système de base de données ou à un tiers sans l'accord unanime du comité de pilotage.

L'Anses est responsable de l'intégrité des données et de la confidentialité des informations enregistrées dans la base de données *Lm* de l'UMT Armada, via la gestion des droits utilisateurs permettant de maîtriser le niveau d'accès à l'information.

En particulier, les informations suivantes sont classées comme sensibles : l'identité du laboratoire, le numéro initial des souches, la région/le département, la ville et le code postal; seul le pays d'origine est obligatoire. Toutes ces informations sont stockées dans la base mais ne sont pas consultables librement par les utilisateurs de la base.

La Direction générale de l'alimentation (DGAL) peut être amenée à effectuer une demande de consultation uniquement en cas d'enquête officielle selon l'exigence de la loi. Toutes les données de la base sont susceptibles d'être mises à sa disposition.



Profils PFGE *AscI* de *Listeria monocytogenes*

Dans ce cas, une demande est formulée directement auprès de l'Anses (Laboratoire de sécurité des aliments de Maisons-Alfort). L'utilisateur propriétaire des données est informé avant toutes transmissions.

### Exemples d'utilisation

La base de données partagée peut être utilisée au titre de la surveillance de *Lm* exercée par une entreprise au sein de ses ateliers d'abattage, de découpe ou de fabrication de produits transformés. Cela permet à l'entreprise d'avoir une vision de la diversité des souches circulantes dans l'environnement de ses ateliers et de relier cette diversité à celle de souches isolées de matières premières ou de produits finis, afin de mieux tracer les origines de contamination des pièces de découpe/produits finis. L'utilisation de la base de données multi filières permet à l'entreprise de visualiser la fréquence d'observation des profils PFGE de ses souches pour sa filière d'activité mais aussi pour les autres filières alimentaires. Cela peut aussi lui permettre d'évaluer la dangerosité des souches qu'elle isole si les informations sont présentes dans la base pour les souches présentant les mêmes profils PFGE combinés *ApaI* et *AscI*.

La base de données *Lm* peut être utilisée afin de résoudre des incidents ponctuels de contamination. Dans la mesure où l'entreprise exerce une surveillance de *Lm* dans ses ateliers au jour le jour, la mise en évidence d'un produit contaminé sur une ligne de production sera plus vite reliée à une origine de contamination (matériel, matières premières), en croisant les données de typage contenues dans la base. L'entreprise pourra alors enrayer plus rapidement la dissémination de cette contamination et dans certains

cas, pourra remonter au(x) fournisseur(s) de matières premières contaminées.

Cette démarche peut également être utilisée pour évaluer l'efficacité des procédures de nettoyage et de désinfection des ateliers et des équipements sur les souches circulantes ou persistantes dans une entreprise.

## Conclusion

Cette base de données partagée est un outil clé de la surveillance et de l'amélioration des connaissances relatives à *Lm*.

Sa vocation est d'aider les entreprises à la gestion du risque *Lm* dans les filières alimentaires, en particulier la filière porcine par une meilleure compréhension (1) des phénomènes de transmission des souches entre maillons (2) de

l'implantation des souches en entreprise, et par une meilleure caractérisation des souches circulantes.

Elle ne peut jouer pleinement son rôle que si chaque maillon de la filière (élevage, abattage/découpe, transformation, distribution) y participe en l'abondant.

Au-delà du cadre de l'UMT Armada qui se clôture fin 2016, cette base continuera d'être enrichie par l'Anses et les Instituts Techniques. Elle contribuera ainsi au dispositif national de surveillance des souches de *Lm* circulant dans la filière porcine.

## Remerciements

Ce projet a reçu le soutien financier de l'ACTIA.

## Références bibliographiques

- Barrett T.J., Gerner-Smidt P., Swaminathan B. 2006. Interpretation of pulsed-field gel electrophoresis patterns in foodborne disease investigations and surveillance. *Foodborne Pathog Dis*. 3(1): 20-31
- Boscher, E., Houard, E., and Denis, M. 2012. Prevalence and distribution of *Listeria monocytogenes* serotypes and pulsotypes in sows and fattening pigs in farrow-to-finish farms (France, 2008). *J Food Prot* 75, 889-895.
- Denis, M., Kerouanton, A., Rose, V., Quesne, S., Courtilon, C., and Rouxel, S. (2011). Prevalence and characterization of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* in french raw pork meat at the distribution level. Paper presented at: Safe Pork 2011 (Maastricht, the Netherlands).
- Doumith M, Buchrieser C, Glaser P, Jacquet C, Martin P. 2004. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 42:3819-3822.
- EFSA (European Food Safety Authority), 2011. The food classification and description system. FoodEx2 (draft-revision1). Supporting Publications 2011:EN-215, 438 pp.
- Félix B., Roussel S., and Pot, B. 2015. Harmonization of PFGE profile analysis by using bioinformatics tools: example of the *Listeria monocytogenes* European Union Reference Laboratory. In *Pulse Field Gel Electrophoresis Methods and Protocols*, K.J.M. Dalmasso, ed. (Springer Protocols, Humana Press), pp. 9-28.
- Félix B., Danan C., Van Walle Ivo, Lailler R., Texier T., Lombard B., Brisabois A., Roussel S., 2014. Building a molecular *Listeria monocytogenes* database to centralize and share PFGE typing data from food, environmental and animal strains throughout Europe. *J. Microbiol. Methods*, 104, 1-8.
- Félix B., Dao Trinh Tam., Lombard Bertrand., Asséré Adrien., Brisabois A., Roussel S., 2012. The use of Pulsed Field Gel Electrophoresis in *Listeria monocytogenes* sub-typing - Harmonization at the European Union Level, *Gel Electrophoresis - Principles and Basics*, Dr Sameh Magdeldin (Ed.), ISBN: 978-953-51-0458-2, InTech, Available from <http://www.intechopen.com/books/gel-electrophoresis-principles-andbasics/harmonization-of-listeria-monocytogenes-pfge-sub-typing-at-european-union-level>.
- INVS, site web: <http://www.invs.sante.fr/fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Risques-infectieux-d-origine-alimentaire/Listeriose/Donnees-epidemiologiques>
- Kerouanton A., Marault M., Petit L., Grout J., Dao T.T., Brisabois A. 2010. Evaluation of a multiplex PCR assay as an alternative method for *Listeria monocytogenes* serotyping. *J Microbiol Methods*, 80, 134-137
- Michelon, D., Felix, B., Vingadassalon, N., Mariet, J.F., Larsson, J.T., Moller-Nielsen, E., and Roussel, S. 2015. PFGE standard operating procedures for *Listeria monocytogenes*: harmonizing the typing of food and clinical strains in Europe. *Foodborne Pathog Dis* 12, 244-252.
- Tourdjman M., Laurent E., Leclercq A., 2014. Listériose humaine: une zoonose d'origine alimentaire. *Revue Française des Laboratoires*, 2014 (464), 37-44.

## Référence bibliographique de cet article

- FELIX B., MICHELON D., PRENOM C., ROBIEU E., ROUSSEL S., FEURER C., 2016. Une base de données de typage partagée pour la surveillance de *Listeria monocytogenes*. *Les Cahiers de l'IFIP*, 3(1), 53-58.