

**RAPPORT ANNUEL D'ACTIVITE DU
CENTRE NATIONAL DE REFERENCE
DES *LISTERIA***



ANNEE 2007

DIRECTEUR :	A. LE MONNIER
DIRECTEUR ADJOINT :	A. LECLERCQ
SECRETAIRE :	M. BELIN
COLLABORATEURS :	V. CADET-DANIEL H. DIEYE A. MORVAN M. RAGON
DATE :	Mars 2008

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. Le Monnier and A. Leclercq. 2007. Rapport annuel d'activité du Centre national de Référence des Listeria – Année 2007. Institut Pasteur, Paris, France.) dont elles sont issues.

TABLE DES MATIERES

RESUME DE L'ANNEE 2007.....	7
1 INTRODUCTION.....	8
1.1 Personnel permanent.....	11
1.1.1 Organigramme general.....	11
1.1.2 Effectif.....	12
1.2 Locaux.....	13
1.3 Mise en place de la démarche de management de la Qualité au sein du CNRL.....	13
2 ACTIVITES D'EXPERTISE DU CNR DES <i>LISTERIA</i>.....	15
2.1 Capacités techniques, rôles et missions du CNR des <i>Listeria</i>	15
2.1.1 Identification et caractérisation des souches de <i>Listeria</i>	15
2.1.1.1 Méthodes disponibles et marqueurs épidémiologiques disponibles.....	15
2.1.1.2 Techniques développées en 2007.....	16
2.1.1.3 Méthodes en développement.....	18
2.1.2 Maintien, détention et diffusion de matériel biologique.....	18
2.1.2.1 Les souches bactériennes.....	18
2.1.2.2 Les Serums.....	21
2.1.2.3 Diffusion de matériel biologique.....	21
2.1.2.4 Conditions de mise à disposition de ces collections.....	22
2.1.3 Techniques recommandées par le CNRL.....	22
2.1.3.1 Recommandations générales.....	22
2.1.3.1.1 En microbiologie clinique.....	22
2.1.3.1.2 En microbiologie vétérinaire.....	24
2.1.3.1.3 En microbiologie des aliments.....	24
2.1.4 Travaux d'évaluation et d'amélioration des techniques, réactifs et trousse.....	27

2.1.5	Gestion, protection et sauvegarde de la base de données du CNRL.....	27
2.2	Surveillance de la listériose humaine.....	28
2.2.1	Surveillance microbiologique de la listériose en France.....	29
2.2.2	Surveillance et signalement.....	30
2.2.3	Phase de surveillance renforcée.....	32
2.2.4	Phase d'Alerte	32
2.2.5	Surveillance de la résistance aux antibiotiques	33
2.2.6	Détection et analyse des infections nosocomiales	34
2.3	Contribution aux réseaux de surveillance internationaux	35
2.3.1	Laboratoire Communautaire de Référence des <i>Listeria monocytogenes</i>	35
2.3.2	Centre Collaborateur OMS pour la listériose d'origine alimentaire (CCOMS).....	36
2.3.3	PulseNet Europe.....	38
2.3.4	EC Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF).....	39
3	ACTIVITES DE SURVEILLANCE	40
3.1	Données de la surveillance microbiologique de la listériose humaine	40
3.1.1	Cas de listériose en France	40
3.1.1.1	Définition de cas	40
3.1.2	Analyse globale des cas de listeriose.....	41
3.1.3	Cas de listériose en France métropolitaine	44
3.1.3.1	Distribution temporelle des cas.....	44
3.1.3.2	Distribution géographique des cas.....	47
3.1.3.3	Distribution des cas selon la forme clinique.....	51
3.1.3.4	Distribution des souches selon le groupe PCR.....	58
3.1.4	Cas de listériose dans les DOM-TOM.....	62
3.1.5	Etude de la résistance aux antibiotiques	63
3.1.5.1	Typage moléculaire des souches par macrorestriction d'ADN.....	65
3.2	Caracterisation des souches d'origine non humaine.....	65
3.2.1	Analyse générale	66

3.2.2	Souches isolées d'aliments.....	69
3.2.2.1	Catégories de laboratoires ayant adressé les souches	69
3.2.2.2	Nombre de souches et distribution par espèce.....	70
3.2.2.3	Distribution des souches de <i>L. monocytogenes</i> par catégorie d'aliment.....	71
3.2.2.4	Distribution des souches de <i>L. monocytogenes</i> par groupe PCR.....	71
3.2.3	Souches isolées de l'environnement.....	72
3.3	Bilan des investigations, signalements et alertes	73
3.3.1	Investigations.....	73
3.3.1.1	Isolement et infection à <i>L. ivanovii</i> subsp. <i>ivanovii</i>	73
3.3.1.2	Suspensions d'infections nosocomiales à <i>L. monocytogenes</i>	75
3.3.1.3	Infection d'origine alimentaire dans les Alpes-Maritimes.....	76
3.3.1.4	Enquête alimentaire dans une cuisine centrale	76
3.3.2	Signalements.....	77
3.3.3	Alertes DGAI.....	78
3.3.4	Alerte DGCCRF.....	80
3.3.5	Enquête des formes neuro-méningées	81
3.3.6	Conclusion	83
4	ACTIVITES D'INFORMATION, DE FORMATION ET DE CONSEIL	84
4.1	Centre de documentation	84
4.2	Diffusion de l'information sur <i>Listeria</i> et la listériose.....	84
4.2.1	Site Internet.....	85
4.2.2	Cours et conférences sur invitation	85
4.2.3	Formation et encadrement	85
4.2.4	Demande d'informations et de conseils.....	86
4.3	Expertise	87
4.4	Retour d'informations	88
5	TRAVAUX DE RECHERCHE EN LIEN DIRECT AVEC L'ACTIVITE DU CNR	90
5.1	Contributions aux études épidémiologiques	90
5.1.1	Surveillance de la listériose en France 2000-2004 : Evaluation des critères d'investigation des cas groupés.....	90

5.1.2	Augmentation du nombre de cas français de listérioses	91
5.1.3	Traçabilité des isolats de <i>L. monocytogenes</i> des industries laitières du lait de brebis en sardaigne	92
5.2	Méthodes de diagnostic et atypies des souches	93
5.2.1	Une nouvelle espèce avirulente et environnementale de <i>Listeria</i> : <i>L. rocourti</i>	93
5.3	Etude de la virulence	93
5.3.1	Etude de la traversée de la barrière placentaire par <i>L. monocytogenes</i>	93
5.3.2	Etude de souches hypovirulentes et virulentes	93
5.4	Développement de nouveaux tests diagnostiques	94
5.4.1	PCR quantitative en temps réel du gène <i>hly</i> pour le diagnostic et la gestion de <i>L. monocytogenes</i>	94
5.5	Développement de nouveaux outils de typage moléculaire	94
5.5.1	Multilocus Sequence Typing of <i>Listeria</i> pour la caractérisation des souches et leur évolution génétique	94
5.5.2	Biodiversité et étude phylogénétique des populations de <i>Listeria</i>	95
5.6	Etude de la résistance aux antibiotiques	96
5.7	Validation de nouvelles thérapeutiques	96
5.7.1	Activités comparées de la Moxifloxacin et de l'amoxicilline contre la croissance intracellulaire de <i>Listeria monocytogenes</i>	97
5.7.2	Efficacité de la moxifloxacin dans les infections du système nerveux central par <i>Listeria monocytogenes</i>	97
5.7.3	Modification de la pharmacocinétique d'un antibiotique due à l'infection par <i>L. monocytogenes</i>	98
5.8	Projets collaboratifs	99
5.9	Conclusion	101
6	LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS	102
6.1	Publications nationales	102
6.2	Publications internationales	102
6.3	Communications nationales	103
6.4	Communications internationales	103
6.5	Conférences sur invitations	104
7	PROGRAMME D'ACTIVITE POUR LES ANNEES 2008-2009	105
	CONCLUSION GENERALE	106

Références citées..... 108

RESUME DE L'ANNEE 2007

Le CNRL a observé une augmentation de 9% du nombre total de cas de listériose diagnostiqués au cours de l'année 2007 par rapport à 2006 (+9%). Même si cette augmentation confirme la tendance observée en 2006 (+31% par rapport à 2005) elle reste cependant moins importante. Toutefois, l'incidence de 4,8 cas par millions d'habitants est la plus élevée depuis 1995. Cette augmentation a essentiellement concerné les formes bactériémiques, alors que le nombre de cas de formes neuro-méningées demeure relativement stable. Par ailleurs, le nombre et la valeur relative des formes materno-néonatales a atteint l'un des niveaux les plus bas depuis 1987. Il semble donc que la population la plus à risque soit constituée principalement des personnes de plus de 60 ans avec ou sans terrain sous-jacent (80% des cas non materno-néonataux). Cette tendance à la recrudescence de la listériose est également observée dans la plupart des pays européens (Goulet et coll. 2008). Elle souligne l'importance de la surveillance microbiologique et épidémiologique de la listériose.

Le CNR des *Listeria* (CNRL), en synergie avec l'InVS, a saisi les différents acteurs de la Santé Publique aux niveaux national, et international (correspondants européens et OMS), afin d'étudier les causes de cette augmentation récente et de proposer des recommandations appropriées, notamment vers les personnes les plus concernées que constituent les personnes de plus de 60 ans.

En 2007, Swaminathan et Gerner-Smidt du CDC d'Atlanta ont signalé l'efficacité du modèle français de surveillance de la listériose, le comparant à celui des USA (Swaminathan B. and Gerner-Smidt P., 2007). Le CNRL qui constitue un acteur incontournable dans ce système de surveillance, poursuit quant à lui l'informatisation des processus de surveillance microbiologique et épidémiologique de la listériose au niveau national dans le but d'accroître sa réactivité face aux situations d'alerte.

Deux épisodes inédits d'isolements chez l'homme ou de contamination humaine (4 patients + 1 cas suspecté) par *Listeria ivanovii subsp. ivanovii* ont été observés en France au cours de cette année 2007. Par ailleurs, un cas de listériose materno-néonatale a été diagnostiqué par biologie moléculaire sans isolement de *L. monocytogenes*. La définition actuelle de la listériose ne permet pas d'inclure ces cas dans les chiffres officiels du CNRL.

Cette année a également vu la description d'une nouvelle espèce non virulente de l'environnement en Europe. Le CNRL français a été sollicité pour apporter son expertise à la caractérisation de cette nouvelle espèce pour laquelle le nom de *L. rocourti* a été proposé.

Dans le cadre de ses missions de veille technologique, le CNRL a développé et validé de nouvelles méthodes de typage moléculaire, en collaboration avec la plate forme de génotypage des pathogènes et de Santé Publique. L'isolement récent de souches issues de patients, résistantes à des antibiotiques d'intérêt clinique, a conduit le CNRL à débiter une étude longitudinale sur la résistance aux antibiotiques en collaboration avec le CNR de la résistance aux antibiotiques. Par ailleurs, dans le cadre de nombreuses collaborations scientifiques avec des laboratoires de recherche de l'institut Pasteur ou extérieurs, le CNRL poursuit ses travaux visant à améliorer le développement d'outils diagnostiques et permettant la caractérisation des souches (détection des principaux facteurs de virulence, étude de la biodiversité et de la structure génétique des populations de *Listeria* et de leur évolution) et de valider de nouvelles alternatives thérapeutiques.

1 INTRODUCTION

La listériose est une infection transmise par les aliments contaminés qui diffère notablement des autres maladies d'origine alimentaire les plus fréquentes par un certain nombre de caractéristiques :

- des groupes de populations plus à risque : les femmes enceintes et leurs nouveau-nés, les personnes âgées et les sujets dont l'immunité cellulaire est diminuée (immunosuppresseurs, corticothérapies, cancer, etc.) ;
- la gravité de la symptomatologie des formes invasives : infection du système nerveux central, septicémie/bactériémie chez le nouveau-né et l'adulte, avortement ; depuis plus d'une dizaine d'années, des cas de gastro-entérites fébriles à *L. monocytogenes* sont également décrits (Ooi et coll., 2005) ;
- un coût associé à la prise en charge des cas individuels élevé, avec hospitalisation systématique et prise en charge médicale spécialisée ;
- une mortalité importante pour les formes invasives : 20 à 30 % des cas ; des séquelles fréquentes ; une faible incidence pour les formes invasives : 2 à 7 cas par million d'habitants ;
- enfin une prévalence différente entre les pays industrialisés et les pays en développement où elle est apparemment quasi absente. Ceci peut s'expliquer par le manque de moyens diagnostiques et de système de surveillance appropriés, et la prévalence élevée de nombreuses autres pathologies infectieuses. Cependant, un certain nombre d'arguments permettent de penser que cette inégalité de répartition géographique de l'infection est liée aux différences de modes de production et de consommation des aliments (production industrielle, utilisation de la chaîne du froid, développement des aliments consommés en l'état) et à l'évolution démographique caractérisée par un accroissement du nombre de personnes âgées et par une augmentation du nombre de sujets immunodéprimés (cancers et thérapeutiques immunosuppressives), dans les pays industrialisés.

La listériose humaine évolue essentiellement sous forme de cas sporadiques, et survient plus rarement par petites bouffées épidémiques, voire de véritables épidémies comme ce fut le cas depuis 1981 sur le continent nord-américain (Anonyme 1998a et 1998b ; Boggs et coll., 2001 ; Dalton et coll., 1997 ; de Valk et coll., 2000, 2001a et 2001b ; Farber et coll., 2001 ; Fleming et coll., 1985 ; Frye et coll., 2002 ; Linnan et coll., 1988 ; Proctor et coll., 1995 ; Schlech et coll., 1983) et en Europe, notamment en France (Anonyme, 1993a et 1993b ; Aureli et coll., 2000 ; Bille, 1991 ; de Valk et coll., 2001 ; Ericsson et coll., 1997 ; Goulet et coll., 1993, 1995b et 2002 ; Jacquet et coll., 1995a ; Lyytikäinen et coll., 2000 ; McLauchlin et coll., 1991 ; Miettinen et coll., 1999 ; Salamina et coll., 1996).

En conséquence, un certain nombre de pays industrialisés ont instauré des systèmes de surveillance spécifiques de cette infection, souvent depuis plus d'une dizaine d'années ou plus. Ces systèmes sont pour la plupart fondés sur la centralisation des souches isolées de patients et d'aliments dans un laboratoire/centre de référence, permettant leur étude systématique et comparative et sur la déclaration obligatoire des cas.

La Direction Générale de la Santé (DGS) s'est munie depuis 1982 d'un tel système de surveillance avec le Centre National de Référence des *Listeria* (CNRL) localisé initialement à la Faculté de Médecine de Nantes auquel a été adjoint en 1990 le CNRL pour la lysotypie et le typage moléculaire situé à l'Institut Pasteur. Depuis la fermeture du CNR de Nantes en juillet 1993, en raison du départ en retraite de son responsable, le Centre National de Référence des *Listeria* est hébergé par le Laboratoire des *Listeria* situé à l'Institut Pasteur qui assure seul la surveillance microbiologique de la listériose en France. Son mandat de CNRL a été renouvelé le 1^{er} janvier 2006. Le CNRL s'est engagé à assurer les missions définies par l'arrêté du 29 novembre 2004 fixant les modalités de désignation et les missions des CNR.

Les missions particulières du CNRL sont les suivantes :

- Typer en routine par une méthode discriminante basée sur le géotypage les souches humaines qui lui sont adressées et mettre en oeuvre une nomenclature des souches basée sur cette méthode
- Disposer d'une expertise des méthodes diagnostiques utilisées en santé humaine comme la sérologie ou les méthodes moléculaires de diagnostic rapide
- Etudier la sensibilité aux antibiotiques des souches isolées chez l'homme
- Contribuer au développement des méthodes de typage et à la diffusion de ces techniques aux laboratoires d'analyse de biologie médicale
- Tendre vers l'exhaustivité des souches humaines afin de pouvoir détecter les cas groupés
- Collaborer avec les structures (laboratoires, Afssa, etc.) travaillant en santé animale et sur les aliments (échange d'informations, de souches, etc.)
- Contribuer en liaison avec l'Institut de Veille Sanitaire à la surveillance épidémiologique notamment en situation de cas groupés en comparant la souche humaine concernée aux souches isolées d'aliments et en donnant des informations sur la fréquence d'isolement de cette souche parmi les souches humaines isolées antérieurement.
- Participer en lien avec l'Institut de Veille Sanitaire à des études de recherche appliquée notamment aux projets de recherche internationaux,
- Contribuer en lien avec l'Institut de Veille Sanitaire aux systèmes de surveillance internationaux et en particulier européens notamment dans le cadre de l'application de la directive zoonoses 2003/99/CE,

- Contribuer à l'alerte en signalant à l'Institut de Veille Sanitaire 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'Institut de veille sanitaire), modification des formes cliniques (répartition, modification de leur expression clinique, formes inhabituelles), apparition d'un nouveau phénotype de résistance, etc.

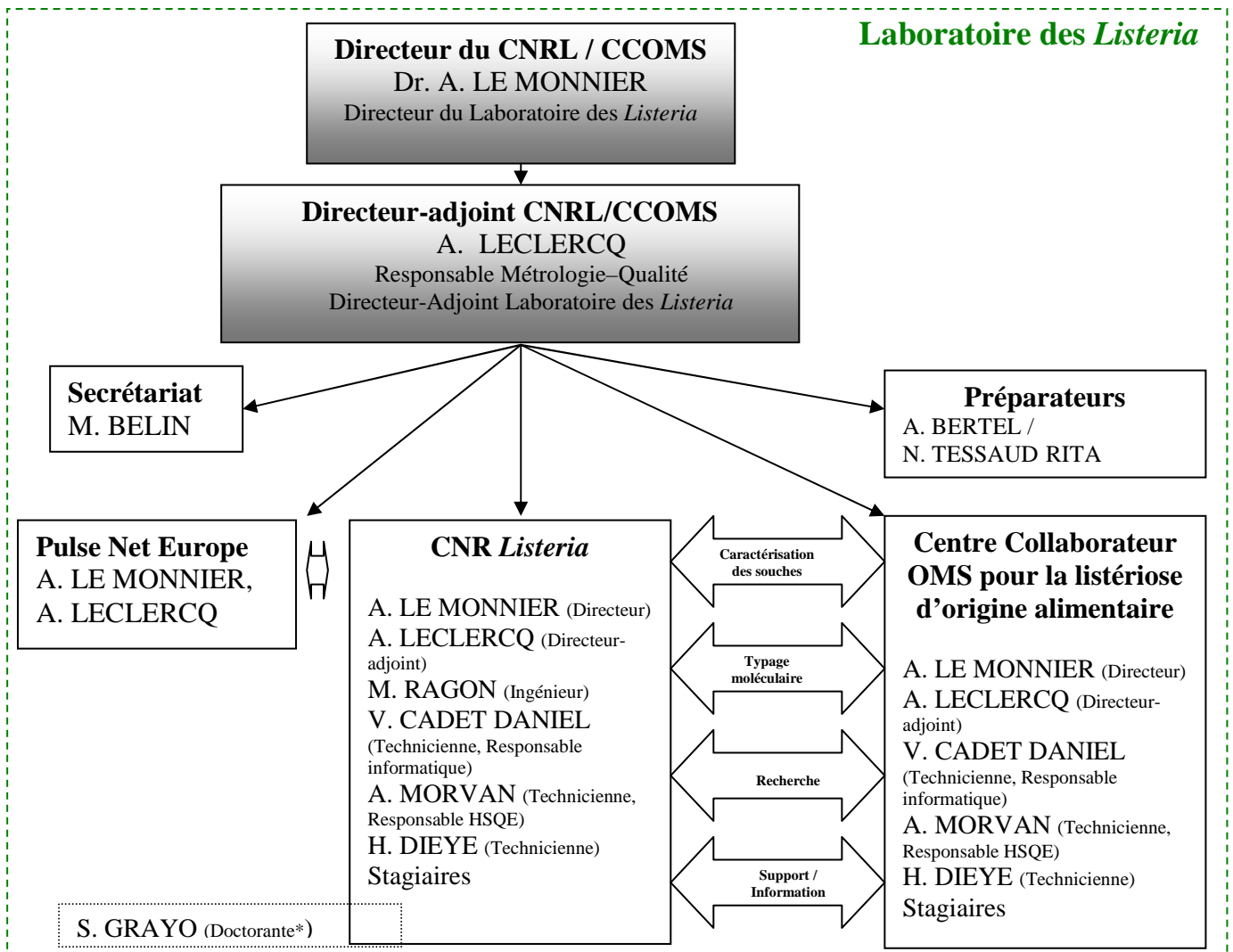
Les données de ces CNR en matière de surveillance microbiologique ont été régulièrement publiées (Courtieu, 1985 et 1986 ; Espaze et coll., 1989, 1990 et 1991 ; Goulet et coll., 2001, 2004 et 2005 ; Jacquet et coll., 1994, 1995b, 1998, 2001, 2002 et 2007; Rocourt et coll. , 1992b et 1997). Aux données du CNR s'ajoutent celles des enquêtes du Laboratoire National de la Santé (Goulet et coll., 1986, 1987, 1989 et 1990), celles du Réseau EPIBAC du Réseau National de Santé Publique (de Benoist et coll., 1999) et depuis 1998 celles de la déclaration obligatoire (Goulet et coll., 2001, 2004, 2005 et 2006). L'évolution de la listériose en France est similaire à celle qui est observée dans d'autres pays : à une très grande majorité de cas sporadiques s'ajoutent de petites bouffées épidémiques (Lemagny et coll., 1989 ; Rocourt et coll., 1989), voire de véritables épidémies (Anonyme, 1993a et 1993b ; de Valk et coll., 2001 ; Goulet et coll., 1995b, 1998 et 2002 ; Jacquet et coll., 1995a).

Le Laboratoire des *Listeria* étant par ailleurs Centre Collaborateur de l'OMS pour la listériose d'origine alimentaire, il peut également participer, à un degré variable, à la surveillance de cette infection pour certains pays étrangers.

1.1 PERSONNEL PERMANENT

1.1.1 ORGANIGRAMME GENERAL

Figure 1 : Organigramme Général du Personnel du CNR des *Listeria* (en grisé, le personnel cadre)



* financement Europathogenomics

1.1.2 EFFECTIF

L'effectif du personnel du CNRL est présenté dans le tableau 1.

Tableau 1 : Personnel du CNR des *Listeria*

Nom – Prénom	Libellé Emploi	% Act*.	% Section Bud.**	ETP***
LE MONNIER Alban	Pharmacien biologiste	100,00	50,00	0,50
LECLERCQ Alexandre	Ingénieur épidémiologiste	100,00	70,00	0,70
RAGON Marie (CDD)	Ingénieur	100,00	100,00	1,00
MORVAN Anne	Technicienne supérieure de laboratoire	100,00	90,00	0,90
CADET-DANIEL Véronique	Technicienne supérieure de laboratoire	100,00	80,00	0,80
DIEYE Hélène (CDD)	Technicienne supérieure de laboratoire	100,00	90,00	0,90
BELIN Martine	Secrétaire	50,00	50,00	0,25
RITA TESSAUD Nathalie	Aide de Laboratoire	80,00	40,00	0,32
BERTEL Arnaud	Aide de Laboratoire	100,00	35,00	0,35
TOTAL Equivalent Temps Plein (ETP)				5,92

*% Act. : il s'agit du contrat de travail, c'est-à-dire les personnes travaillent à l'IP à temps complet (100%) ou temps partiel (50, 60, 70, 80 ou 90%).

**% Section Bud. il s'agit du pourcentage de leur temps de travail affecté à l'activité CNR

***ETP il s'agit du % activité multiplié par la quote part affecté à l'activité du CNR : ainsi si une personne travaille à temps plein et que le poste est affecté à 50% au CNR, l'ETP sera de 0.5 (soit 50%).

1.2 LOCAUX

Laboratoires et bureaux:

Le CNR des *Listeria* (CNRL) est hébergé dans les locaux du Laboratoire des *Listeria* de l'Institut Pasteur en 2007 au second étage du bâtiment Roux (53A) de l'Institut Pasteur, 25 rue du Dr. Roux, 75015 Paris.

Les pièces suivantes sont dédiées à l'activité du CNRL ainsi qu'au Centre collaborateur de l'OMS pour la listériose d'origine alimentaire (CCOMS) :

Pièces du CNRL :

Pièce 6A: Bureau du Directeur-adjoint du CNR/CCOMS/Laboratoire des *Listeria*, partagée avec un(e) étudiant(e) en doctorat et un stagiaire et servant également de salle de réunion et de bibliothèque,

Pièce 6: Secrétariat – Bureau administratif,

Pièce 5B: Bureau du Directeur du CNR/CCOMS/Laboratoire des *Listeria*,

Pièce 5: Laboratoire P2, accueillant 5 personnes et incluant une salle de PCR, une salle d'électrophorèse et de centrifugation et une salle de pesée des produits chimiques,

Pièce 30: Archives et stockage,

Pièce 31: Pièce avec conditionnement d'air comportant la collection de microorganismes du CNR des *Listeria*.

Pièces partagées du CNRL:

Des pièces sont partagées avec d'autres CNR et laboratoires de l'Institut Pasteur et se situent au même étage : une laverie/salle des autoclaves, une salle de préparation et une chambre froide.

L'ensemble de ces pièces suit le processus de la marche en avant du propre vers le sale.

1.3 MISE EN PLACE DE LA DEMARCHE DE MANAGEMENT DE LA QUALITE AU SEIN DU CNRL

La mise en place du Management de la qualité dans les CNRs est, depuis l'année 2000, un objectif prioritaire de la Direction de l'Institut Pasteur. Le Service « Hygiène Sécurité Qualité et Environnement (HSQE) » de l'Institut Pasteur coordonne cette action et met à disposition une qualitiennne pour l'ensemble des CNR. Le service Formation assure des formations à la gestion de la Qualité adaptées aux besoins spécifiques, et de nombreux services support de l'Institut

Pasteur (tel le laboratoire de métrologie, le service de réception des produits biologiques, etc.) appuient le CNRL par leurs prestations.

Le Management de la Qualité est important dans le cadre des activités d'expertise du CNRL. Il garantit la fiabilité des résultats et constitue un gage de reconnaissance vis-à-vis des laboratoires qui adressent spontanément leurs souches d'autocontrôle de façon volontaire ou issues de leurs recherches au CNR pour identification et caractérisation moléculaire.

Ainsi, le CNRL s'est engagé depuis une dizaine d'années dans une démarche de management de la Qualité concernant l'organisation et les analyses qu'il effectue. Depuis 2003, le fonctionnement du CNRL est conforme au GBUI (Guide de Bonne Utilisation de l'Informatique). Tous les processus qui entrent dans le cadre de l'activité de CNRL répondaient aux exigences du GBEA, choisi dans un premier temps comme référentiel. La réalisation d'un audit qualité en Octobre 2006 visant à redéfinir et optimiser le système de Management de la Qualité du CNRL pour ces prochaines années a conduit à choisir le référentiel NF EN ISO CEI 17025 :2005. Les procédures et les documents d'enregistrement sont en cours de révision pour répondre aux exigences de ce nouveau référentiel.

→ Outre le management de la qualité, l'établissement de ces documents qualité et leur application permet une traçabilité totale des essais réalisés au CNRL, ce qui constitue un avantage en cas de problème juridique ou de saisie des documents techniques dans le cadre d'une procédure juridique.

Les lignes d'essais qui seront soumises à ce projet d'accréditation seront les suivantes :

- Identification phénotypique (Méthode interne)
- Groupage PCR des souches de *Listeria monocytogenes* (Méthode interne)
- Electrophorèse en champ pulsé de l'ADN génomique de *Listeria monocytogenes* digéré par l'enzyme de restriction *AscI* (Protocole Pulsenet Europe)
- Electrophorèse en champ pulsé de l'ADN génomique de *Listeria monocytogenes* digéré par l'enzyme de restriction *ApaI* (Protocole Pulsenet Europe)

→ En 2007, une enquête satisfaction « client » et sa procédure de traitement attenante ont été préparées pour être effectuées en 2008. L'établissement d'une nouvelle version du manuel qualité a été amorcé Les fiches de renseignement des souches humaines et non humaines ont été révisées.

→ En 2007, une seule réclamation d'un correspondant a été enregistrée par le responsable qualité et a abouti à la modification de la fiche type de transmission des informations sur les cas de listériose entre l'InVS et les DDASS qui laissait supposer que la souche envoyée par le correspondant était une *Listeria monocytogenes* avant que le CNRL n'ait obtenu ses résultats d'analyses.

2 ACTIVITES D'EXPERTISE DU CNR DES *LISTERIA*

Dans le cadre de ses missions, le CNR des *Listeria* est en charge de la surveillance microbiologique et épidémiologique de la listériose d'origine humaine en France. Le CNR a par ailleurs de nombreuses autres activités transversales notamment de support technique ainsi que biologique pour l'identification et la caractérisation des souches d'origine non humaine, de contribution aux réseaux internationaux de surveillance, de diffusion de l'information, de veille technologique et de développement de nouvelles techniques de typage dans le cadre de ses activités de recherche.

2.1 CAPACITES TECHNIQUES, ROLES ET MISSIONS DU CNR DES *LISTERIA*

2.1.1 IDENTIFICATION ET CARACTERISATION DES SOUCHES DE *LISTERIA*

2.1.1.1 METHODES DISPONIBLES ET MARQUEURS EPIDEMIOLOGIQUES DISPONIBLES

Le CNRL reçoit les souches isolées de patients par les biologistes médicaux [laboratoires publics hospitaliers et plus rarement de Laboratoires d'Analyses de Biologie Médicale (LABM) privés]. Le CNRL reçoit également des souches isolées d'aliments ou de l'environnement envoyées par les laboratoires d'hygiène et de contrôle des aliments publics agréés (LVD, LDA, SCL, Laboratoires privés, etc.) dans le cadre d'alertes sanitaires de la Direction Générale de l'Alimentation (DGAl) ou de la Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes ou d'investigations autour de cas. Ces souches font systématiquement l'objet des analyses suivantes qui ne sont alors pas facturées :

- **Vérification de la pureté** des souches réceptionnées sur gélose nutritive.
- **Confirmation de l'identification au genre et à l'espèce** par des tests biochimiques.
- **Détermination du sérotype PCR** selon la méthode précédemment publiée par le CNRL (Doumith et coll., 2004 et 2005) qui a remplacé la méthode classique de sérotypage depuis le 01/03/05 (Seeliger et Höhne, 1979).
- **Analyse des profils de macrorestriction d'ADN génomique** (PFGE : électrophorèse en champs pulsé) obtenus au moyen du système d'électrophorèse CHEF et des enzymes de

restriction *AscI* et *ApaI* selon le protocole international standardisé du CDC d'Atlanta et des réseaux PulseNet décrit par Graves *et coll.* en 2001 (Graves et Swaminathan, 2001).

- **Antibiogramme** de toutes les souches d'origine humaine en utilisant la technique de dilution en milieu gélosé selon les recommandations du CA-SFM. Ces antibiogrammes sont effectués sur un panel de 20 antibiotiques incluant notamment de nouvelles molécules récemment commercialisées et/ou non testées auparavant (exemple : linézolide, moxifloxacine, levofloxacine, etc.). Les souches détectées comme résistantes aux antibiotiques sont alors transférées au CNR de la Résistance aux Antibiotiques à l'Institut Pasteur pour confirmation du résultat et étude approfondie du mécanisme de résistance le cas échéant.

Par ailleurs, dans le cadre de son activité d'expertise mais hors alerte, le CNRL reçoit également des souches envoyées par son réseau de correspondants microbiologistes des laboratoires d'hygiène et de contrôle des aliments publics ou privés ou d'industriels, pour identification, caractérisation et typage. Ces prestations sont alors facturées au client demandeur et celui-ci est averti que les résultats obtenus pour ses souches pourront le cas échéant être communiqués aux autorités sanitaires dans le cadre de la surveillance nationale de la listériose.

→ **En 2007, le CNR a reçu un total de 1544 souches** (contre 1657 souches en 2006) dont 359 souches d'origine humaine, 953 souches d'origine environnementale ou alimentaire dans le cadre d'alertes sanitaires, d'investigations ou de demandes client et 232 souches de pays étrangers dans le cadre des activités du CCOMS (cf. chapitres 2.4.1).

2.1.1.2 TECHNIQUES DEVELOPPEES EN 2007

Identification moléculaire des *Listeria* par séquençage du gène du 16S rADN.

Personnes responsables du projet au CNRL : A. Leclercq – A. Le Monnier

En collaboration avec le centre d'identification moléculaire des bactéries du Professeur P. Grimont de l'Institut Pasteur et de la plate-forme de génotypage des pathogènes et santé publique.

Le CNRL, en cas de difficultés sur l'identification de la souche envoyée par un correspondant, pratique une amplification génique et un séquençage sur environ 1400 pb du gène codant les ARNr 16S. Ce nouveau service a permis de décrire une espèce nouvelle de *Listeria* en 2007 et d'identifier 3 souches avec des profils atypiques en séro groupe PCR. Toutes les souches non *Listeria* présentant quelques caractéristiques phénotypiques du genre sont expertisées par cette méthode.

Macrorestriction d'ADN de *L. monocytogenes* par PFGE avec l'enzyme de restriction *SmaI*

Personnes responsables du projet au CNRL : A. Leclercq – V. Cadet Daniel

En collaboration avec le CDC d'Atlanta (USA)

Lors de comparaison des souches où l'interprétation des profils de macrorestriction d'ADN obtenus avec les enzymes *AscI* et/ou *ApaI* est difficile (1 bande de différence en moins ou une bande de taille moindre), une macrorestriction d'ADN est effectuée avec l'enzyme de restriction *SmaI* et ce depuis 2004. Le CNRL n'exploitait que ponctuellement ces profils pour la comparaison de plusieurs souches. En effet, la multiplication des bandes de faibles poids moléculaires et la faible résolution obtenue avec les conditions classiques de migration rendaient ces profils difficilement interprétables. Une collaboration entre le CNR *Listeria* et les CDC d'Atlanta a été entreprise pour améliorer les conditions techniques. Le partage des protocoles de chaque entité a permis d'optimiser les conditions de migration et de valider l'analyse des profils après transfert des images des gels obtenus par e-mail. Cette collaboration permettra probablement d'établir un protocole international standardisé pour l'utilisation de l'enzyme *SmaI* en PFGE. La macrorestriction d'ADN par la combinaison des enzymes *AscI*, *ApaI* et *SmaI* constitue un outil de typage moléculaire très discriminant par rapport aux schémas à deux enzymes et a déjà démontré son utilité dans l'étude fine de signalements [Signalements 2007 : L07/14, L07/12, L07/10, L07/09, L07/07, L07/06, L07/04, L07/03]. La base de données du CNRL constituée depuis 2004 a permis de confirmer certaines données obtenues par le CDC d'Atlanta. Le CNRL actualise cette base en étudiant toutes les souches avec ce nouveau protocole.

Le *Multilocus Sequence Typing* (MLST)

Personnes responsables du projet au CNRL : M. Ragon - H. Dieye - A. Le Monnier

En collaboration avec la plate-forme de génotypage des pathogènes et santé publique IP-InVS (S. Brisse)

Présentation sous forme d'un poster « Multilocus Sequence Typing of Listeria for strain characterization and evolution » au 16th International Symposium On Problems Of Listeriosis (ISOPOL), Savannah, USA (Mars 2007).

La caractérisation moléculaire des souches et l'étude de la biodiversité des populations de *Listeria* sont primordiales. Elles constituent, en effet, la base de la surveillance microbiologique et épidémiologique, permettant l'investigation des cas groupés et des épidémies et l'identification du véhicule alimentaire à l'origine des cas humains.

Le *Multilocus Sequence Typing* (MLST) est une technique qui génère des données standardisées et reproductibles déjà utilisée pour le typage moléculaire de nombreuses espèces bactériennes. Ainsi, le CNRL a développé, en collaboration avec la Plate-Forme de Génotypage des Pathogènes et Santé Publique, un schéma MLST spécifique de *L. monocytogenes* et a évalué son pouvoir discriminant sur 350 souches en comparaison de celui de la macrorestriction d'ADN en champ pulsé (PFGE) actuellement admise comme la technique de référence. Si la MLST n'apparaît pas plus discriminante que le PFGE, elle procure néanmoins des informations complémentaires au PFGE. En effet, la MLST indique les liens de parenté entre les souches. Ceci permet d'étudier la biodiversité et la structure génétique des populations de *Listeria* et de

décrire les processus de microévolutions. L'ensemble des données sont regroupées dans une base de données ouverte et accessible au lien suivant <http://www.pasteur.fr/mlst/Listeria>. Plusieurs équipes ont d'ores et déjà enrichi la banque de pulsotypes de *L. monocytogenes*.

2.1.1.3 METHODES EN DEVELOPPEMENT

Optimisation du typage moléculaire de *L. monocytogenes* en termes de rapidité, de coût et de débit analytique en situation de crise

Personnes responsables du projet au CNRL : M. Ragon - A. Leclercq - A. Le Monnier

Sérotypage des *Listeria*

Personnes responsables du projet au CNRL : V. Cadet Daniel - A. Leclercq

Le CNRL a été confronté en 2007 à plusieurs demandes de sérotypage classique des souches de *Listeria* notamment dans le cadre de projet de recherche. Le CNRL a d'abord constaté des résultats discordants avec d'autres laboratoires correspondants effectuant le sérotypage classique et une baisse des performances concernant le sérotypage des souches de *L. monocytogenes* effectués au moyen du kit commercialisé par la firme DENKA SEIKEN (Japon). Bien qu'ayant alerté les responsables de cette firme, nous n'avons à ce jour aucune réponse. Le CNRL ne recommande donc plus ce kit pour le sérotypage des *Listeria monocytogenes*. Le sérotype des souches et non leur groupe PCR est sollicité par des équipes de recherche étudiant *L. monocytogenes* et des laboratoires travaillant pour des entreprises agro-alimentaires. En effet, dans certains cas, il s'agit de pouvoir comparer les résultats à ceux obtenus pour des souches antérieures aux sérogroupages PCR ou dans d'autres cas la demande de sérotypage est motivée par l'analyse de souches environnementales et notamment de sérotypes rares et peu impliqués dans les cas cliniques (laboratoires correspondants et laboratoires validant des kits commerciaux) En conséquence, le CNRL propose de nouveau le sérotypage et en a informé l'InVS. Pour cela, le CNRL produira les sera délicats sous management de la qualité pour lesquels le kit DENKA SEIKEN (et d'autres kits) présente une performance analytique insuffisante (sera IV et IX). Le CNRL évaluera également, si les moyens financiers le permettent, les autres kits commercialisés de sérotypage de *Listeria*.

2.1.2 MAINTIEN, DETENTION ET DIFFUSION DE MATERIEL BIOLOGIQUE

2.1.2.1 LES SOUCHES BACTERIENNES

Chaque année, la collection du CNRL s'incrémente de plus de 1.500 souches, parfois beaucoup plus comme en situation épidémique (à comparer aux 10.000 souches annuelles dans les années 1990s). Les souches d'espèces non *L. monocytogenes* sont de plus en plus rarement envoyées au CNRL en raison du coût d'envoi et du faible intérêt du résultat pour le laboratoire, à l'exception de *L. ivanovii* présentant un intérêt clinique dans le domaine vétérinaire.

→ En 2007, le CNR a constaté que certains laboratoires de Biologie Médicale correspondants attendent parfois d'avoir la confirmation de l'identification *L. monocytogenes* via le retour de la caractérisation du CNR pour effectuer la DO du cas. Le CNRL a saisi la cellule *Listeria* en Août 2007 sur ce point afin qu'une communication soit faite sur le point que la DO doit être effectuée avant l'envoi au CNRL dans le but d'éviter un risque de sous-estimation des cas.

On considère qu'il existe 7 catégories de souches envoyées au CNR :

1. Les souches d'origine clinique ;
2. Les souches d'origine alimentaire ou issues de l'environnement de ces aliments, isolées dans le cadre d'investigation autour de cas isolés, de cas groupés ou épidémiques et lors d'enquêtes ponctuelles à la demande de l'InVS, de la DGS, de la DGAI ou de la DGCCRF;
3. Les souches d'origine alimentaire ou issues de l'environnement de ces aliments, isolées dans le cadre d'alertes produits avec saisie ou retrait ou rappel de produit. En effet, des « alertes produits » peuvent survenir, correspondant à des non-conformités aux critères réglementaires (présence de *L. monocytogenes* ou dépassement du seuil de 100 *L. monocytogenes/g*), ou à des situations considérées comme une menace pour la santé du consommateur ;
4. Les souches d'origine alimentaire issues des plans de surveillance et des plans de contrôle placés sous la responsabilité de la DGAI et de la DGCCRF. Pour cette catégorie, dès lors que l'on se trouve en situation d'alerte produit telle que décrit au point 3 ci-dessus, la souche passe de la catégorie 4 à la catégorie 3;
5. Les souches d'origine environnementale ou alimentaire issues de contrôles officiels ;
6. Les souches d'origine alimentaire provenant de « clients » particuliers dites « souches d'autocontrôles » (industriels dans le cadre d'autocontrôles, LVD, laboratoires privés d'hygiène et de contrôle etc.). Il convient de souligner que ces interlocuteurs peuvent exiger la confidentialité de l'information transmise vis-à-vis des autorités sanitaires, ce qui peut constituer un point de faiblesse en termes d'exhaustivité de l'information recueillie ;
7. Les souches vétérinaires transmises par les laboratoires vétérinaires départementaux (LVD) dans le cadre de la santé animale ;
8. Les souches environnementales (origines hydriques, aliments pour animaux, sol, etc.) ;
9. Les souches issues de programmes de recherche.

Leur mise en collection permet de disposer d'une banque de souches (associées à une banque de données scientifiques et clinico-biologiques) très importante, véritable Centre de Ressource Biologique à la disposition des chercheurs, géré sous procédure de management de la qualité (cf. chapitre 1.4.).

Par ailleurs, le CNRL maintient et met à disposition gracieusement et sur simple demande motivée, les souches type des espèces de *Listeria* et les souches de référence pour la sérotypie. Des souches caractéristiques du genre *Listeria* et de l'espèce *L. monocytogenes* sont

régulièrement mises en collection au sein de la Collection de l'Institut Pasteur et du Centre de Ressource Biologique (CIP-CRBIP, structure accréditée par le COFRAC et certifiée ISO9001v2000 par l'AFAQ) qui met à disposition des souches caractérisées moyennant une somme couvrant les frais d'envoi et de maintien en collection sous management de la qualité.

⊗ En 2007, le CNRL a stimulé les laboratoires d'analyses vétérinaires pour l'envoi de souches afin d'avoir en collection pour chaque année un ensemble représentatif des souches de chaque origine utile en cas d'études rétrospectives, de compréhension de mécanismes tel que la virulence de *L. monocytogenes* ou la sélection de clone le long de la chaîne alimentaire. Neuf souches vétérinaires ont été réceptionnées dans ce cadre. Il est apparu que le diagnostic vétérinaire d'une listériose chez l'animal (méningite, avortement, etc.) n'entraînait pas systématiquement un envoi de la souche vers le CNR et donc ces souches ne rentraient pas dans la surveillance nationale de la listériose (Règlement EC 2003/99). Pourtant, si un cas de listériose animale est diagnostiqué dans un troupeau laitier dont la ferme livre une laiterie produisant du fromage, son envoi au CNRL, constituerait un élément précieux pour le fonctionnement du système de surveillance et l'identification des sources (potentielles ou réelles) à l'origine des cas humains.

Les différentes collections de souches bactériennes

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

Le CNRL dispose des souches types des 7 espèces et sous espèces du genre *Listeria* (*L. monocytogenes*, *L. ivanovi* subsp. *ivanovii*, *L. ivanovii* subsp. *londoniensis*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri* et *L. grayi*) ainsi que des 15 souches de référence pour la sérotypie. Ces souches sont conservées en gélose profonde dans des pièces à température contrôlée et à -80°C en tube à cryo-billes.

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

Le CNRL conserve toutes les souches de *Listeria* qui lui sont adressées, quelle que soit leur origine. Ces souches sont conservées en gélose profonde dans des pièces à température contrôlée. Cette collection, majoritairement française mais également internationale (CCOMS) comportait environ 102.000 souches à la fin de l'année 2007. Ces souches sont d'origine clinique, environnementale et alimentaire ainsi que vétérinaire. La grande majorité des souches a été isolée postérieurement à 1992. Néanmoins, le CNRL conserve certaines souches isolées entre 1987 et 1992 provenant de la collection du CNR alors hébergé au CHU de Nantes.

Une culture des souches d'origine humaine isolées en France est également conservée à -80°C en tube à cryo-billes dans un congélateur sous alarme permanente (cadre d'astreinte contacté en cas de panne).

- Special *Listeria* Culture Collection (SLCC)

Il s'agit de la collection unique de *Listeria* du Professeur H.P.R. Seeliger (Würzburg, Allemagne) qui comporte plus de 5.000 souches isolées entre 1926 et 1985. L'intérêt majeur de cette collection est de contenir des souches anciennes, isolées depuis la découverte de *L. monocytogenes* (1926). Ces souches sont majoritairement vétérinaires puis cliniques (surtout

après 1955), environnementales ou alimentaires. 80% des souches de cette collection ont été isolées entre 1955 et 1987 de diverses origines géographiques avec cependant une majorité en provenance de France et d'Allemagne.

- 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 (accréditée COFRAC selon l'ISO 17025 pour des essais de caractérisation des souches et certifiée AFAQ ISO 9001 :2000 pour son organisation) où le CNRL a versé sous contrat 152 souches qui constitue un échantillon représentatif des souches françaises humaines et non humaines du genre *Listeria* de 1981 à nos jours (souches d'épidémies, de travaux de séquençage, de sérotypes rares, souches de référence, souches types, etc.). Les informations associées aux souches sont regroupées dans une base de données informatique (logiciel ARPAS). Le CRBIP facilite ainsi l'accès de ces ressources biologiques aux clients, aux chercheurs, en France et à l'étranger suivant les normes de sécurité pour la santé et l'environnement, conformément aux règlements et aux lois en vigueur, en assurant une utilisation durable et une traçabilité maximale.

2.1.2.2 LES SERUMS

Le CNR produisait les 13 sérums anti-protéines somatiques, et si nécessaire les 5 sérums anti-protéines flagellaires, utilisés pour la caractérisation antigénique des souches de *L. monocytogenes* et des autres espèces de *Listeria*. Depuis l'abandon de la sérotypie au profit du groupage par PCR multiplex (Doumith et coll., 2004), la production de ces sérums a été arrêtée mais un stock minimum a été maintenu. Aucune commercialisation ou distribution de ces sera en 2007 n'a été effectuée. Chaque sérum représenterait un coût annuel de production de 800 euros.

2.1.2.3 DIFFUSION DE MATERIEL BIOLOGIQUE

➔ En 2007, 3 envois ont été réalisés sous MTA (Mutual Technical Agreement) au Centre INRA, UR 1282, de Tours, France, au Laboratoire de Microbiologie de l'Institut Supérieur d'Agronomie, Lisbonne, Portugal et à l'Institute für Milch Hygiene, National Reference Center for *Listeria monocytogenes* d'Autriche. Ils ont concerné 40 souches dont 6 souches de sérotypes rares. Le CNRL a été sollicité par des compagnies privées pour acheter des souches et par l'organisateur d'un projet scientifique qui sollicitait 2000 souches. Cette demande n'a pas été honorée à ce jour, dans l'attente de précisions concernant les objectifs de ces études.

➔ En 2007, le CNRL a proposé pour la première fois de diffuser des extraits purifiés d'ADN de souches de référence et des souches de collection afin d'éviter l'envoi des souches qui est coûteux et réglementairement de plus en plus difficile.

2.1.2.4 CONDITIONS DE MISE A DISPOSITION DE CES COLLECTIONS

Les échanges des souches de collections avec un tiers font l'objet d'un accord mutuel technique demandeur-CNR, nommé MTA, permettant de juger de la pertinence de la demande, de la recevabilité du demandeur en termes de transfert de responsabilités attenantes à ces souches, de s'assurer de l'utilisation de ces souches ne tendant pas à les distribuer ou à les revendre, et de référencer en cas de publication le CNRL ou le CRBIP.

2.1.3 TECHNIQUES RECOMMANDEES PAR LE CNRL

2.1.3.1 RECOMMANDATIONS GENERALES

2.1.3.1.1 EN MICROBIOLOGIE CLINIQUE

Concernant les prélèvements cliniques à la recherche de *L. monocytogenes*, le CNRL recommande de suivre les recommandations du REMIC (Anonyme, 2007b).

Par ailleurs, dans le cas de demande de PCR sur échantillons biologiques ou de sérologie, les cadres du CNRL transfèrent la demande au service de Microbiologie de l'Hôpital Necker.

Le CNRL recommande de suivre les recommandations du Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM ; Anonyme, 2007a) pour l'étude de la sensibilité des souches de *L. monocytogenes* aux antibiotiques d'intérêt clinique.

Recommandations particulières

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

Hémoculture : milieux commerciaux classiques

LCR : Bouillon nutritif glucosé à 0,5%

Selles : méthodes alternatives validées AFAQ AFNOR pour *Listeria* spp. et *Listeria monocytogenes* (cf ci-dessous)

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

- *Identification*

Le CNRL recommande les galeries API *LISTERIA* (bioMérieux), à défaut API *CORYNE* (bioMérieux). Les galeries API *COYRNE* 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 pas d'effectuer le sérotypage sauf pour les sérotypes 1/2a, 1/2b, 1/2c et 4b avec le kit de sérotypage de la firme DENKA SEIKEN (Japon) étant donné la faible performance des sera dans ce kit.

- *Antibiogramme*

Méthode de diffusion en gélose Mueller-Hinton supplémentée avec 5% de sang ou non

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

Le CNRL ne peut effectuer de recommandations sur l'ensemble des antibiotiques à tester faute d'études scientifiques effectuées sur un nombre conséquent de souches de *L. monocytogenes* visant à déterminer les concentrations critiques minimales et maximales pour chaque antibiotique.

- *Sérodiagnostic*

Le CNRL ne peut effectuer de recommandations faute d'études prospectives sur de larges cohortes décrivant les performances des tests actuellement disponibles. Ces tests de sérodiagnostic peuvent constituer un appoint au diagnostic (sans intérêt si germe isolé) en cas de forte suspicion de listériose au cours d'une grossesse fébrile ou d'une rhombencéphalite sans isolement du microorganisme dans le LCR. Les résultats de ce sérodiagnostic ne sont pas pris en compte dans la surveillance nationale (Anonyme 2007b, Sérodiagnostic de la listériose, chapitre 40, REMIC).

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

- La méthode du service de microbiologie à l'Hôpital Necker-Enfants Malades qui repose sur l'utilisation d'un dot-blot pour détecter les anticorps totaux anti-lystériolysine O (LLO) grâce à des antigènes purifiés d'une partie de la protéine seulement, LLO-411. Des titres de 1/100 à 1/5000 sont constatés dans l'infection aiguë. La positivité est le plus souvent associée à des phases d'infection évolutives avec foyers profonds notamment dans les cas d'encéphalite ou avec 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, ces performances sont moindres. Compte tenu de traces sérologiques dans les faibles dilutions (à rapporter à une précédente contamination par *L. monocytogenes*, non toujours symptomatique), il est indispensable de réaliser deux tests à 15 jours d'intervalle pour affirmer une séroconversion. En cas de résultat négatif, il est utile de réaliser un nouveau test à 15 jours d'intervalle. 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). Des titres d'anticorps agglutinants de 1/320 à 1/640 au-delà de 10 jours d'infection sont constatés.

- *PCR en point final ou temps réel sur LCR*

Le CNRL ne peut effectuer de recommandations, faute d'études prospectives sur de larges

cohortes de patients décrivant les performances des tests de détection moléculaire de *L. monocytogenes* disponibles. Ainsi, les résultats de la PCR ne sont pas pris en compte à ce jour dans la surveillance nationale.

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

- Gamme RealArt artus (PCR en temps réel) pour *L. monocytogenes* sur l'automate Lightcycler (QIAGEN),
- Gamme RAPID (PCR en temps réel) pour *Listeria* spp.,
- La méthode de PCR temps réel sur le gène *hly* développée par le service de microbiologie de l'Hôpital Necker-Enfants Malades pour *L. monocytogenes*.

2.1.3.1.2 EN MICROBIOLOGIE VETERINAIRE

Le CNR recommande de suivre les instructions de l'Organisation Internationale des Epizooties téléchargeables à l'adresse :

http://www.oie.int/fr/normes/mmanual/pdf_fr/Chapitre%20final05%202.10.14_Listeria.pdf

2.1.3.1.3 EN MICROBIOLOGIE DES ALIMENTS

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

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

Alternativement à ces méthodes de référence, le CNRL recommande les méthodes alternatives validées par AFAQ AFNOR (Tableaux 2 et 3) disponibles sur le site : <http://www.afnor-validation.org/afnor-validation-methodes-validees>.

En tout état de cause, le CNR des *Listeria* recommande à ses laboratoires correspondants ou interlocuteurs de se conformer aux recommandations émanants du Laboratoire National de Référence des *Listeria monocytogenes* situé à l'AFSSA-LERQAP (Maison Alfort).

Tableau 2 : Liste des méthodes alternatives validées AFAQ AFNOR pour la détection et l'énumération de *Listeria* spp. en microbiologie des aliments et de l'environnement.

NOM COMMERCIAL	TYPE DE METHODE	PRODUCTEUR
Vidas <i>Listeria</i>	Tests immuno-enzymatiques Détection des <i>Listeria</i> spp	BIOMERIEUX
Vidas <i>Listeria</i> Species Xpress	Tests immuno-enzymatiques Détection des <i>Listeria</i> spp	BIOMERIEUX
Vidas <i>Listeria</i> DUO	Tests immuno-enzymatiques Détection des <i>Listeria monocytogenes</i> et <i>Listeria</i> spp	BIOMERIEUX
Rapid <i>Listeria</i> spp	Milieux de culture Détection des <i>Listeria</i> spp	BIO-RAD
iQ Check <i>Listeria</i> spp	PCR - Détection des <i>Listeria</i> spp	BIO-RAD
Oxoid <i>Listeria</i> rapid test	Tests immunologiques Détection des <i>Listeria</i> spp	OXOID THERMOFISHER
Transia Plate <i>Listeria</i>	Tests immuno-enzymatiques Détection des <i>Listeria</i> spp	RAISIO DIAGNOSTICS SAS
TRANSIA STRIP <i>Listeria</i>	Tests immunologiques Détection des <i>Listeria</i> spp	RAISIO DIAGNOSTICS SAS
Tecra Ultima <i>Listeria</i>	Tests immuno-enzymatiques Détection des <i>Listeria</i> spp	TECRA INTERNATIONAL Pty Ltd

Tableau 3 : Liste des méthodes alternatives validées AFAQ AFNOR pour la détection et l'énumération de *Listeria monocytogenes* en microbiologie des aliments et de l'environnement.

NOM COMMERCIAL	TYPE DE METHODE	PRODUCTEUR
ALOA One Day	Milieux de culture Détection des <i>Listeria monocytogenes</i>	AES Chemunex
ALOA Count™	Milieux de culture Dénombrement des <i>Listeria monocytogenes</i>	AES Chemunex
Ottaviani Agosti Agar	Milieux de culture Détection des <i>Listeria monocytogenes</i>	BIOMERIEUX
Vidas <i>Listeria monocytogenes</i> 2 Protocole commun avec Vidas <i>Listeria</i> (comporte une étape d'enrichissement à 30°C)	Tests immuno-enzymatiques Détection des <i>Listeria monocytogenes</i>	BIOMERIEUX
Vidas <i>Listeria monocytogenes</i> 2 Protocole commun avec Vidas <i>Listeria</i> (comporte une étape d'enrichissement à 37°C)	Tests immuno-enzymatiques Détection des <i>Listeria monocytogenes</i>	BIOMERIEUX
Vidas <i>Listeria</i> DUO	Tests immuno-enzymatiques Détection des <i>Listeria monocytogenes</i> et <i>Listeria</i> spp	BIOMERIEUX
Rapid L'Mono (Recherche)	Milieux de culture Détection des <i>Listeria monocytogenes</i> et <i>Listeria</i> spp	BIO-RAD
Rapid L'Mono (Dénombrement)	Milieux de culture Détection des <i>Listeria monocytogenes</i>	BIO-RAD
IQ Check <i>Listeria monocytogenes</i>	PCR Détection des <i>Listeria monocytogenes</i> / Detection of <i>Listeria monocytogenes</i>	BIO-RAD
CHROMagar™ <i>Listeria</i>	Milieux de culture Détection des <i>Listeria monocytogenes</i>	CHROMagar
CHROMagar™ <i>Listeria</i> numeration	Milieux de culture Dénombrement des <i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	CHROMagar
Lumiprobe 24 <i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	Tests d'hybridation moléculaire Détection des <i>Listeria monocytogenes</i>	EUROPROBE SA
GeneDisc Cyler <i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	PCR Détection des <i>Listeria monocytogenes</i>	GENESYSTEMS
Accuprobe <i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	Tests d'hybridation moléculaire Détection des <i>Listeria monocytogenes</i>	GEN-PROBE Inc
<i>Listeria</i> Precis™	Milieux de culture Détection des <i>Listeria monocytogenes</i>	OXOID Ltd
<i>Listeria</i> Precis™	Milieux de culture Dénombrement des <i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	OXOID Ltd
Compass <i>Listeria</i> Agar	Milieux de culture Détection des <i>Listeria monocytogenes</i>	SOLABIA / Division BIOKAR DIAGNOSTICS
Compass <i>Listeria</i> Agar dénombrement	Milieux de culture Dénombrement des <i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	SOLABIA / Division BIOKAR DIAGNOSTIC

2.1.4 TRAVAUX D’EVALUATION ET D’AMELIORATION DES TECHNIQUES, REACTIFS ET TROUSSES

Ces travaux d’amélioration des techniques sont décrits dans les chapitres 2.1.1.3. et 5.

2.1.5 GESTION, PROTECTION ET SAUVEGARDE DE LA BASE DE DONNEES DU CNRL

L’ensemble des données épidémio-clinico-microbiologiques collectées pour chaque souche est rassemblé dans le Système Informatique de Laboratoire (SIL) du CNRL. Le logiciel LAGON[®] (Epicconcept) est utilisé depuis le 1er janvier 2005. Il a remplacé le logiciel EPISURV[®] (EpiConcept) précédemment utilisé depuis 1995. Outre la gestion en temps réel des échantillons (suivi administratif, enregistrements des résultats techniques, etc.), le logiciel LAGON[®] permet l’anonymisation des données, leur archivage ainsi qu’une meilleure traçabilité. Une mise à jour du logiciel LAGON[®] a été effectuée en 2007 pour permettre d’optimiser l’accès à l’information lors de discussions téléphoniques avec des laboratoires correspondants ou les autorités sanitaires et sa compatibilité avec d’autres logiciels type logiciel Bionumerics 4.5 (Applied maths, Belgique) permettant l’analyse et le stockage des profils de macrorestriction dans les dossiers des souches.

En effet, le CNRL possède une base de données des profils de macrorestriction des souches réceptionnées au CNRL depuis 2005 qui comporte outre les 5500 profils de macrorestriction, le numéro de la souche, son origine humaine-alimentaire-autre, le numéro d’alerte associé, son pays de provenance, sa sensibilité aux antibiotiques, des remarques et les numéros de ces profils. Grâce à cette base de données, le CNRL a partiellement informatisé la comparaison des profils qui nécessite toujours des comparaisons à l’œil nu pour interpréter des résultats et lui permet d’attribuer avec fiabilité un numéro de nomenclature ce qui constitue une des missions du cahier des charges du CNRL. Ces bases de données sont hébergées sur le serveur central de l’Institut Pasteur dans un espace dédié sous accès protégé et les données sont sauvegardées quotidiennement de façon centralisée et automatisée.

☒ Fin 2007, il a été entrepris des études de faisabilité concernant :

- la dématérialisation des données au CNRL pour obtenir un dossier par souche entièrement informatisé (numérisation des demandes clients, des enregistrements papiers, des profils de macrorestriction et de groupage PCR, etc.) ce qui aurait un intérêt en termes d’échange d’informations, d’archivage et de facilité de transfert du système.
- une transmission sécurisée par un courrier électronique (réglementairement très cadrée) des rapports d’essais aux laboratoires correspondants et des rapports de la surveillance nationale (e-mail non sécurisé actuellement à la cellule *Listeria*).
- une informatisation complète de la surveillance nationale qui est encore manuelle mais cependant efficace à ce jour au regard des nombreux points à aborder.

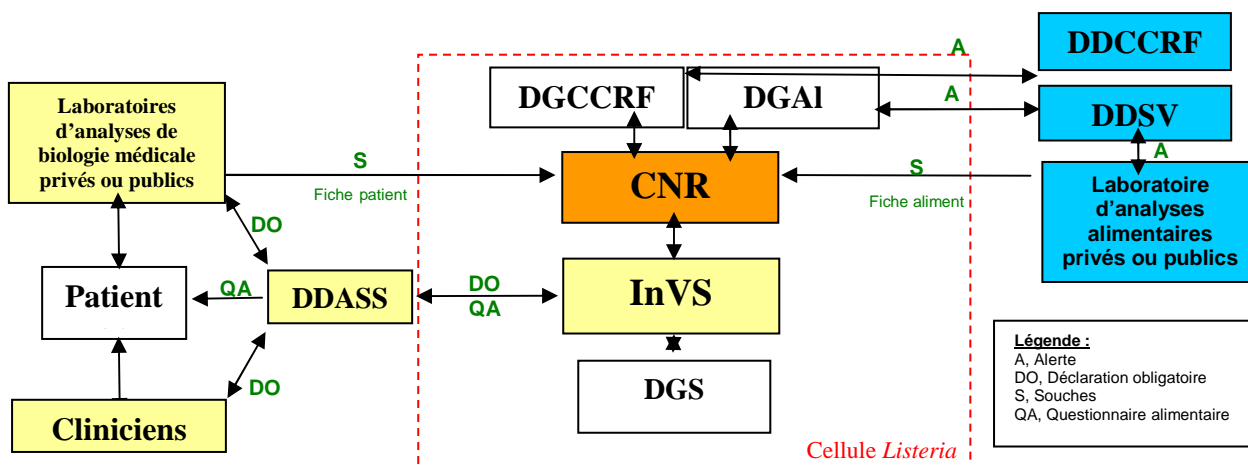
- une possibilité de collecter de façon plus complète des informations clinicobiologiques en lien avec l'InVS dans le but d'effectuer notamment une enquête prospective nationale par le remplissage d'un dossier sécurisé sur le web au moyen du logiciel VOOZANOO® (Epiconcept, France)

2.2 SURVEILLANCE DE LA LISTERIOSE HUMAINE EN FRANCE

Le CNRL participe activement à la surveillance microbiologique et épidémiologique des cas de listériose en France ainsi qu'aux investigations destinées à identifier le véhicule alimentaire responsable de cas (Figure 2). Cette surveillance est réalisée en étroite collaboration avec la Direction Générale de la Santé (DGS), l'Institut de Veille Sanitaire (InVS), la Direction Générale de l'Alimentation (DGAI) et la Direction Générale de la Consommation, de la Concurrence et de la Répression des Fraudes (DGCCRF) selon une procédure mise au point depuis 1992 et désormais bien éprouvée (Goulet, 1995a ; Martin et coll., 2003 ; Veit, 1995), qui a abouti à la rédaction d'un document de gestion de crise en 1996. Ce document est validé depuis janvier 2004 sous la forme d'une « Procédure relative au fonctionnement de la Cellule *Listeria* chargée de la coordination des investigations et des actions autour de cas groupés de listériose » et est en cours de révision.

Les missions de cette cellule sont la détection des cas groupés de listériose, la proposition et la coordination des investigations et des actions à mettre en œuvre suite à la survenue de cas groupés potentiellement liés à une source commune de contamination, leur gestion et leur prévention. Au sein de cette « Cellule *Listeria* », l'InVS et le CNR ont un rôle d'appui scientifique, technique et d'aide à la décision auprès des Directions des 3 ministères concernés.

Figure 2 : Schéma de fonctionnement de la cellule *Listeria* conformément aux textes officiels en vigueur.



CNR : Centre national de Référence des *Listeria* ; InVS : Institut de Veille Sanitaire ; DGAI : Direction Générale de l'Alimentation ; DDSV : Directions Départementales des Services Vétérinaires ; DCCRF : Direction Départementales de la Consommation et de la Répression des Fraudes ; DGCCRF : Direction Générale de la Consommation et de la Répression des Fraudes ; DDASS : Directions Départementales des Affaires Sanitaires et Sociales ; DGS : Direction Générale de la Santé.

→ Au cours de l'année 2007, la « *Procédure relative au fonctionnement de la Cellule Listeria chargée de la coordination des investigations et des actions autour de cas groupés de listériose* » et les différents textes (« *Enquête alimentaire*»; « *Modalités d'échange d'information LNR - CNR* ») qui s'y rapportent ont été actualisés à l'issue de plusieurs réunions de travail.

→ Au cours de l'année 2007, l'entrée du Laboratoire National de Référence des *Listeria monocytogenes* situé à l'AFSSA-LERQAP (Maison Alfort) au sein de la Cellule *Listeria* avec une période transitoire d'intégration, a été décidée. Cette nouvelle configuration de la Cellule *Listeria* nécessite une clarification du rôle de chaque intervenant, ce qui sera fait au cours d'une réunion programmée début 2008 entre l'InVS, la DGAI, le LNR et le CNR. En effet, il est indispensable que les différents laboratoires correspondants disposent d'une procédure précise d'acheminement des souches qui assure in fine une surveillance optimale de la listériose.

2.2.1 SURVEILLANCE MICROBIOLOGIQUE DE LA LISTERIOSE EN FRANCE

La surveillance réalisée par le CNRL se fonde en premier lieu sur la caractérisation des souches isolées de patients et adressées par les biologistes. Ceci s'explique pour les raisons suivantes :

- 1) les signes cliniques de la listériose, quelle que soit la forme considérée, ne sont en rien pathognomoniques. Son diagnostic étiologique est donc bactériologique ;
- 2) la listériose est une infection grave entraînant l'hospitalisation, ce qui facilite la réalisation des prélèvements ;
- 3) le diagnostic de la listériose repose actuellement sur l'isolement de *L. monocytogenes* à partir d'un ou plusieurs prélèvement(s) biologique(s) normalement stérile(s) (sang, liquide céphalo-rachidien, etc.) ou à partir des prélèvements périnataux.

Les cas diagnostiqués par une autre technique, que ce soit par biologie moléculaire ou par sérologie ne sont actuellement pas retenus dans la définition de la listériose, y compris celle récemment redéfinie par l'ECDC en 2006. En effet, le sérodiagnostic traditionnel (antigène constitué de bactéries entières détruites par la chaleur) n'est pas fiable et les nouvelles méthodes de sérodiagnostic (basée sur la listériolysine purifiée) ou de PCR spécifique n'ont pas encore fait l'objet d'une validation sur une grande série de tests.

L'activité de surveillance consiste à :

- Recueillir un minimum d'informations au sujet des cas. Les principales étant : âge, sexe, date et site du prélèvement, département de résidence (ou à défaut utilisation du département du laboratoire expéditeur de la souche), forme clinique, pathologie sous-jacente, évolution, etc. Ces informations sont obtenues grâce à une fiche élaborée par le CNRL et accessible sur le site Internet de l'Institut Pasteur, à laquelle s'ajoutent

éventuellement des appels téléphoniques pour compléter les informations manquantes, indispensables à la surveillance ;

- Identifier les souches doublons notamment en ce qui concerne les patients transférés ou les couples mère-enfant lors de cas de listériose materno-néonatale ;
- Suivre les grandes tendances (répartition des formes cliniques, caractéristiques des souches, évolution du nombre de cas, etc.) ;
- Détecter les épidémies, par la surveillance et la détection des cas groupés, en caractérisant (par une technique de groupage par PCR et par profils de macrorestriction d'ADN en champ pulsé) les souches isolées lors de ces infections et en suivant l'évolution des différentes souches observées ;
- Participer à l'étude des phénomènes épidémiques : en identifiant les cas épidémiques pour suivre l'évolution de l'épidémie et transmettre cette information à l'InVS pour les enquêtes cas-témoin ; en participant à l'identification du véhicule alimentaire par la détection des aliments contaminés par la souche épidémique parmi les souches isolées d'aliments et adressées au CNRL ; en caractérisant la souche épidémique par comparaison avec les souches responsables des précédentes épidémies.

Jusqu'en janvier 2000, la détection de la souche épidémique était effectuée à partir des résultats de sérotypie et de lysotypie puis les souches étaient immédiatement caractérisées par leurs profils de macrorestriction d'ADN. A partir de janvier 2000, la lysotypie ayant été abandonnée, leur détection était réalisée à partir des résultats de sérotypie et de macrorestriction d'ADN pour les souches d'origine humaine. Le même protocole est également appliqué aux souches d'origine non humaine depuis 2000.

→ Depuis mars 2005, l'identification se fonde sur les résultats du groupage par PCR multiplex et de la macrorestriction d'ADN pour toutes les souches (Graves et coll., 2001 ; Doumith et coll., 2004).

→ **En 2007, 359 souches d'origine humaine ont été reçues concernant 299 cas diagnostiqués par des laboratoires de France métropolitaine et 7 cas diagnostiqués par des laboratoires des DOM-TOM.** L'analyse des données de la surveillance figure dans le chapitre 3.1. du présent rapport. Cette analyse a été effectuée en tenant compte des seuls cas diagnostiqués en 2007 et inclut nécessairement des souches reçues au CNR en 2008 en raison des délais d'isolement et d'envoi des souches (s'étendant habituellement jusqu'au mois Avril).

2.2.2 SURVEILLANCE ET SIGNALEMENT

La surveillance régulière du nombre et des caractéristiques microbiologiques (sérovar, groupe PCR et profils de macrorestriction d'ADN) des souches isolées de cas humains a pour but de détecter rapidement une augmentation du nombre de cas provoqués par une souche unique.

Lors de la surveillance, le CNRL signale par courrier électronique aux autres membres de la Cellule *Listeria* les cas groupés ou tout autre phénomène considéré comme inhabituel ou anormal. Les critères de signalement sont définis dans un document rédigé et mis à jour par la

Cellule *Listeria*.

Ainsi, un cas groupé est défini comme la survenue de plusieurs cas de listériose humaine dus à des souches identiques (c'est-à-dire des souches présentant des caractéristiques microbiologiques identiques par les méthodes de typage de référence utilisées par le CNR), sur une période de temps donnée. Le CNRL transmet alors à la Cellule *Listeria* un tableau avec les informations actuelles et historiques sur les cas de listériose concernés par ce signalement, les caractéristiques microbiologiques de la souche ainsi qu'un historique de la souche parmi les souches d'origine humaine et le récapitulatif des souches isolées de l'environnement et/ou d'aliment durant les 6 derniers mois présentant les mêmes caractéristiques que la souche à l'origine du cas

Depuis le 3 Août 2006, ces critères ont été modifiés sur la base des résultats d'une étude menée conjointement par l'InVS et le CNR (cf. chapitre 5.1.1.). Ainsi, un cas groupé est désormais défini par la survenue de 3 cas ou plus de listériose dont les souches présentent les mêmes caractéristiques microbiologiques et ont été isolés sur une période de 6 semaines au lieu de 3 cas ou plus sur une période de 14 semaines.

➔ En 2007, sur proposition du CNR, les critères d'un signalement ont été modifiés : « un cas groupé est défini par la survenue de 3 cas ou plus de listériose isolés sur une période de 6 semaines dont les souches présentent les mêmes profils de macrorestriction d'ADN pour les enzymes *ApaI* et *AscI* ou des profils jugés similaires ou apparentés (différence d'une bande dans le profil). Ces profils jugés similaires ou apparentés sont incorporés dans la notification des souches du signalement en les distinguant par leur numéro de profil, et leur typage dans un second temps par l'enzyme *SmaI* ». L'InVS analyse alors les informations en tenant compte de ces différences ainsi que des compléments d'informations obtenus auprès de la DGAI, et ne réalise un point sur ce signalement que si les éléments épidémiologiques dont il dispose suggèrent que ces souches peuvent avoir une origine commune.

Depuis 2006, le CNRL a développé et validé une base de données regroupant l'ensemble des données épidémiologiques et microbiologiques (sérotype PCR, profils de macrorestriction d'ADN) concernant les souches d'origine humaine, environnementale ou alimentaire. Cette base de données gérée par le logiciel Bionumerics (Applied Maths) permet non seulement de comparer rapidement les caractéristiques d'un grand nombre de souches et de répondre en temps réel à des questions ponctuelles adressées par la Cellule *Listeria*, mais permet aussi les échanges de profils standardisés entre plusieurs laboratoires ainsi que la constitution d'une nomenclature des profils. Cet outil est utilisé en routine depuis Septembre 2006 et a permis d'optimiser la surveillance microbiologique et épidémiologique à partir du CNR.

➔ En 2007, le CNR a informatisé sa surveillance des signalements en intégrant ces nouveaux paramètres.

→ En 2007, le CNR a effectué 16 signalements (cf. chapitre 3.3.2.).

2.2.3 PHASE DE SURVEILLANCE RENFORCEE

Tout signalement est suivi d'une phase de surveillance renforcée durant laquelle le CNR signale toute nouvelle souche d'origine humaine identique à celle du signalement et l'InVS conduit les enquêtes épidémiologiques appropriées (descriptive et analytique).

Durant cette période, la Cellule *Listeria* pourra décider de rechercher, le cas échéant, l'origine des souches alimentaires ou environnementales présentant des caractéristiques analogues à celles de la souche à l'origine des cas analysés par le CNR.

En fonction des informations rassemblées, la cellule décide des actions et investigations à mettre en œuvre par la Cellule et leurs services déconcentrés. Il s'agit par exemple d'analyser les informations disponibles (résultats des contrôles, retraits de produits, etc.), de demander la transmission au CNR de certaines souches de *Listeria* isolées à la production ou à la distribution, d'identifier des marques de produits commercialisés et/ou de réaliser des prélèvements dans les magasins où s'approvisionnent les patients, d'effectuer des enquêtes dans certains établissements de production, etc.

La phase de surveillance renforcée est considérée comme terminée lorsque plus aucun nouveau cas du à une souche identique à celle du signalement n'est détecté sur une période de 6 semaines. Le CNR informe alors la Cellule *Listeria* de la clôture du signalement et ne signale plus les cas humains avec une souche identique sauf si la Cellule *Listeria* le demande.

→ En 2007, les signalements suivis d'une phase de surveillance renforcée sont décrits dans le chapitre 3.3.2.

2.2.4 PHASE D'ALERTE

En fonction de l'ensemble des informations collectées et de l'évolution du nombre de cas, l'InVS ou tout autre membre de la Cellule peut réunir la Cellule *Listeria* pour statuer du passage en phase d'Alerte.

L'Alerte se définit comme toute situation présentant une menace potentielle pour la santé publique nécessitant la mise en œuvre dans des délais courts des investigations ou des actions complémentaires soit en raison du nombre de cas détectés, soit en raison des hypothèses sur l'origine de la contamination. Dès le déclenchement de l'Alerte, les services déconcentrés peuvent en être informés par leurs administrations centrales respectives.

La Cellule *Listeria* propose les investigations complémentaires et les actions à mener (enquête dans les lieux d'achat des cas, prélèvements d'aliments sensibles ciblés sur certaines catégories, enquête des DDSV dans certains établissements de fabrication ciblés par l'enquête, recherche de l'origine des souches épidémiques alimentaires détectées par le CNRL, enquêtes par les DDSV dans les établissements qui ont fabriqué les aliments, enquêtes complémentaires sur les pratiques

d'hygiène aux différents stades de la production, de la distribution et de la consommation, etc.). Toutes les souches de *Listeria*, isolées dans le cadre des investigations sont envoyées au CNRL.

En phase d'Alerte, les réunions de la Cellule sont fréquentes de façon à pouvoir confronter les éléments recueillis et afin de prendre les mesures de gestion adaptées (communication).

La phase d'Alerte peut être levée par la Cellule *Listeria* en fonction des résultats des différentes investigations et des mesures prises. Lorsque les critères définis dans la procédure de la Cellule *Listeria* sont remplis, le CNRL propose alors à la Cellule *Listeria* de clore le signalement. Certaines mesures spécifiques de surveillance peuvent être maintenues après la levée de l'Alerte.

A noter que les investigations autour des cas groupés ainsi que les situations d'alerte entraînent au niveau du CNR un arrêt partiel, voire total, et immédiat des autres activités durant la période des investigations. Ceci a été notamment le cas durant l'Alerte L06/04 entre Octobre et Décembre 2006 (cf. chapitre 3.3.3.).

→ En 2007, une situation a requis la réunion de la Cellule *Listeria* mais la phase d'Alerte n'a pas été déclenchée (cf. chapitre 3.3.2.).

2.2.5 SURVEILLANCE DE LA RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES

Compte-tenu du très faible pourcentage de souches de *L. monocytogenes* décrites comme résistantes aux antibiotiques, la surveillance de la résistance aux antibiotiques était à ce jour réalisée une fois par an sur toutes les souches responsables des cas humains de listériose. Elle consistait en un screening réalisé par le CNRL sur un panel de 11 antibiotiques régulièrement utilisés en clinique ou utilisés comme marqueur de résistances associées. Le protocole utilisait l'inoculateur de Steer sur milieu gélosé dans lequel l'antibiotique testé est incorporé à 2 ou 4 fois la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) décrite (Charpentier et coll., 1995). Les souches détectées comme résistantes aux antibiotiques, dans les conditions utilisées par le CNRL, étaient transférées au CNR de la Résistance aux Antibiotiques pour confirmation du résultat et étude approfondie du mécanisme de résistance le cas échéant.

Depuis 2006, le CNRL a modifié la méthodologie utilisée pour la surveillance de la résistance aux antibiotiques. La détermination de la sensibilité de toutes les souches d'origine humaine a été effectuée en utilisant la technique de dilution en milieu gélosé selon les recommandations du CA-SFM. Ces antibiogrammes ont été réalisés en une seule fois sur un panel de 20 antibiotiques incluant de nouvelles molécules récemment commercialisées et/ou non testées auparavant (exemple : linézolide, moxifloxacine, levofloxacine, ampicilline, etc.). Les souches détectées comme résistantes aux antibiotiques sont alors transférées au CNR de la Résistance aux Antibiotiques pour confirmation du résultat et étude approfondie du mécanisme de résistance le cas échéant.

Par ailleurs, depuis janvier 2007, la sensibilité des souches humaines est désormais déterminée

prospectivement parallèlement à leur identification et leur caractérisation et non plus en une ou deux séries par an.

Ces changements ont été motivés par :

- la nécessité pour le CNRL de pouvoir déclencher un signalement rapide à la Cellule *Listeria* en cas d'apparition de souches multirésistantes ou d'une évolution des CMI pour un antibiotique d'intérêt clinique ;
- plusieurs sollicitations de LABM pour la réalisation d'antibiogramme nécessitant donc notre réorganisation ;
- la description récente de plusieurs phénomènes émergents concernant la résistance des souches du genre *Listeria* (transfert de matériel génétique depuis les Staphylocoques et les Entérocoques, augmentation de la fréquence d'isolement de souches résistantes dans l'environnement, etc.) indiquant l'intérêt d'une veille plus réactive (Charpentier et coll., 1995 ; Join-Lambert et coll., 2006) ;
- la nécessité de disposer de données épidémiologiques précises ainsi que chiffrées sur la sensibilité des souches et son évolution dans le temps et de pouvoir anticiper un éventuel phénomène d'évolution de la sensibilité aux β -lactamines déjà observé pour d'autres bactéries gram positif;
- le contexte d'un projet collaboratif visant à évaluer la fréquence globale de la résistance parmi les souches d'origine humaine, environnementale ou alimentaire et des tendances évolutives de la sensibilité.

Ceci impose la réalisation de cette surveillance non seulement par l'utilisation d'un protocole standardisé et non plus d'un simple screening mais aussi de l'effectuer en temps réel pour plus de réactivité quant à la détection de phénomènes émergents et permettre une réponse idoine à l'attente de certains biologistes, notamment libéraux, qui en font la demande. Les résultats de la surveillance des souches d'origine humaine isolées en 2007 sont présentés dans le chapitre 3.1.

2.2.6 DETECTION ET ANALYSE DES INFECTIONS NOSOCOMIALES

Bien que des infections nosocomiales aient été décrites pour la listériose, ce mode de transmission demeure très rare et est le plus souvent rapporté pour des infections en maternité. La séquence la plus fréquente est la suivante : un nouveau-né naît d'emblée très contaminé (« *granulomatosis infantiseptica* »), et un deuxième (ou plusieurs), né(s) quelques heures avant ou après, souffre(nt) dans les jours qui suivent de méningite. L'origine de la contamination réside dans les actes médicaux et de soins [thermomètres, couveuses, huile de soins ont été suspectés (Farber et coll., 1991a ; Jean et coll., 1991 ; McLauchlin et Hoffman, 1989 ; Pejaver et coll., 1993 ; Roberts et coll., 1994 ; Rocourt et Seeliger, 1985 ; Schuchat et coll., 1991 ; Sethi et coll., 1989)].

Plus rarement, de telles situations ont été suspectées dans des services d'hospitalisation d'adultes lorsque plusieurs patients ont développé une listériose dans une période courte ou lorsque *L. monocytogenes* a été détectée dans des aliments servis à des patients hospitalisés depuis plusieurs semaines (Elsner et coll., 1997 ; Stamm et coll., 1982).

→ En 2007, ce mode de transmission a été suspecté à 3 reprises. Cependant, aucun épisode d'infection nosocomiale n'a pu être formellement prouvée au regard des investigations menées (cf. chapitre 3.3.1.2.).

→ En 2007, deux contaminations dans deux hôpitaux de France métropolitaine de 4 patients (+1 suspecté) à *Listeria ivanovii subsp. ivanovii* ont été investiguées (cf. chapitre 3.3.1.1.). Cette espèce de *Listeria* est habituellement décrite comme non pathogène pour l'homme mais pathogène pour les animaux.

2.3 CONTRIBUTION AUX RESEAUX DE SURVEILLANCE INTERNATIONAUX

La surveillance microbiologique et épidémiologique de la listériose ne peut plus être uniquement effectuée à l'échelle d'un seul pays ou d'un seul continent. La globalisation des échanges commerciaux internationaux et notamment en matières premières ainsi qu'en denrées alimentaires, nécessite la collaboration entre les différents acteurs de la surveillance et de la prévention à l'échelle internationale.

La France importe et exporte des denrées alimentaires et les citoyens français circulent en France, en Europe et dans le monde : cantonner uniquement la surveillance de la listériose et des *Listeria* à la France serait dommageable.

2.3.1 LABORATOIRE COMMUNAUTAIRE DE REFERENCE DES *LISTERIA MONOCYTOGENES*

En vertu du règlement EC 2003/99, un laboratoire communautaire de référence (LCR) des *Listeria monocytogenes* a été nommé fin 2006 pour une durée de 4 ans par la Commission Européenne. Il se situe au laboratoire AFSSA-LERQAP de Maisons-Alfort qui est également Laboratoire National de Référence des *Listeria monocytogenes*. Ces Laboratoires de référence sont limités en champs d'action à l'espèce *monocytogenes* du genre *Listeria* et aux souches alimentaires ainsi que vétérinaires reliées aux contrôles des zoonoses. Ils ont également pour missions l'étude de l'antibiorésistance des souches zoonotiques et participent à la mise au point de méthodes d'essais dans le domaine alimentaire et vétérinaire pour la détection, énumération et caractérisation des *L. monocytogenes*.

→ En 2007, le CCOMS/CNRL a interrogé le LNR et le LCR sur la fréquence d'isolement par pays européen et en France des souches alimentaires et vétérinaires de *L. monocytogenes* non hémolytiques. Le Comité Européen de Normalisation et la DG SANCO ont ainsi été sensibilisés à cette question. Le LCR a envoyé par la suite une demande officielle au CCOMS de la listériose d'origine alimentaire pour définir l'impact en termes de santé publique des souches de *L. monocytogenes* non hémolytiques (cf. Projet de recherche en cours du CNR/CCOMS (Cf. Chapitre 5)).

2.3.2 CENTRE COLLABORATEUR OMS POUR LA LISTERIOSE D'ORIGINE ALIMENTAIRE (CCOMS)

Compte tenu de son expérience et de son expertise depuis 1986 sur *Listeria* en France, le Laboratoire des *Listeria* est Centre Collaborateur de l'OMS pour la listériose d'origine alimentaire. Auparavant, le Laboratoire des *Listeria* était Centre international de Lysotypie des *Listeria* depuis 1986.

A ce titre, il :

- caractérise un certain nombre de souches qui lui sont adressées par des laboratoires de pays étrangers ;
- participe à la formation de stagiaires scientifiques étrangers ; en 2007, le Laboratoire a reçu de nombreuses sollicitations mais n'a effectivement accueilli qu'un scientifique étranger vétérinaire (A. Palloti de l'Université de Bologne en Italie ayant travaillé sur l'étude des stades de la contamination par *L. monocytogenes* de la filière porcine). Le recrutement d'un directeur adjoint en mars 2007 et le départ progressif du directeur du CNRL à partir de septembre 2007, nous ont incités à différer, voire à renoncer, à l'accueil de plusieurs stagiaires faute de disponibilité pour les encadrer, et les former et à privilégier le travail en collaboration à distance.
- évalue des Risques microbiologiques (MRA) et listériose ;
- recueille des données sur la listériose et *Listeria monocytogenes* dans les aliments pour le site Web MRA ;
- apporte son concours à l'OMS dans le cadre des activités MRA FAO/OMS ;
- encourage la recherche sur les lacunes actuelles des connaissances, en particulier concernant les principales filières alimentaires contribuant à la listériose humaine ;
- travaille en étroite collaboration avec les autres centres collaborateurs OMS (CC) en matière de salubrité des aliments, de surveillance des maladies d'origine alimentaire, d'évaluation du risque microbiologique et de typage des agents pathogènes transmis par les aliments ;
- renforce les capacités techniques de pays en difficulté sur cette thématique
- organise des formations de niveau international et y participe ;
- participe activement à la collecte et à la diffusion des informations ;
- participe à l'impact des *Listeria* dans le Bioterrorisme : collabore avec l'OMS en matière de préparation et d'action dans le domaine du bioterrorisme et recueille, pour le compte de l'OMS, des informations sur le bioterrorisme en ce qui concerne *Listeria monocytogenes* dans l'alimentation.

En 2007, le CCOMS a reçu 232 souches adressées par 8 laboratoires de 7 pays étrangers :

- Europe : 165 souches (Belgique 4, République Tchèque 5, Italie 134, Monaco 1, Pays-Bas 21);
- Afrique : 21 (Maroc 21) ;
- Amérique du Sud : 46 (Argentine 46)

Ces souches ont été adressées :

- pour la surveillance des infections humaines (Italie 7, Monaco 1, Pays-Bas 21, Maroc 1, République Tchèque 1) ;
- dans le cadre d'études sur la fréquence de contamination des aliments par *Listeria* ou dans le cadre de travaux de recherche spécifique ou d'épidémies (Argentine 46, Maroc 20, Belgique 4, République Tchèque 4, Italie 127).

→ En 2007, le CCOMS a apporté son aide et son expertise en comparant 142 profils de macrorestriction pour l'Institut de Santé Publique du Chili de souches alimentaires et en expertisant pour le Centre de Référence de la République Tchèque des souches humaines et alimentaires adressées dans le cadre de l'investigation d'une épidémie survenue à l'Automne 2006.

→ En 2007, le CCOMS a coopéré avec l'Agence de sécurité sanitaire des Aliments des Pays-Bas pour confirmer la caractérisation de souches humaines et alimentaires atypiques (non hémolytiques) provenant d'un cas groupé aux Pays-Bas et a expertisé la fréquence des caractéristiques microbiologiques de ces souches dans la base de données du CCOMS et du CNRL pour connaître si la contamination est autochtone ou non et étudier leur spécificité à la filière porcine.

→ En 2007, le CCOMS a étudié des souches de *L. ivanovii* isolée durant l'étude dans de l'environnement de 10 fromageries de lait de Brebis en Sardaigne et envoyées par la faculté vétérinaire de Sassari, Sardaigne. Ce typage a été effectué suite au partenariat avec ce laboratoire qui avait notamment conduit à accueillir une stagiaire doctorante (Anna-Laura Pilo) durant une période de 3 mois en 2006. Un article est en cours de rédaction (Cf. Chapitre 5).

Le CCOMS possède un site web à l'adresse :

<http://www.pasteur.fr/sante/clre/cadrecnr/Listeria-index.html>

et également au sein du site web de l'OMS à l'adresse :

http://www.who.int/whocc/Detail.aspx?cc_ref=FRA-85&cc_tor1=Listeria&

→ En 2007, le laboratoire des *Listeria* a soumis sa candidature pour une nouvelle mandature comme CCOMS de la listériose d'origine alimentaire basée sur de nouvelles missions qui seront développées dans le prochain rapport d'activités 2008 du CNR des *Listeria*.

→ En 2007, l'OMS a sollicité le laboratoire des *Listeria* sur :

- un rapport sur l'augmentation des cas de listériose en France et dans le monde afin de le diffuser sur le réseau **INFOSAN (International Food Safety Authorities Network)** pour la divulgation rapide d'informations spécifiques concernant la sécurité alimentaire. INFOSAN a

deux composantes majeures: 1) INFOSAN Emergency pour les situations d'urgence en matière de sécurité alimentaire, lorsqu'un risque imminent de maladie grave ou de mort est présent, et 2) un réseau d'informations pour la dissémination d'informations importantes sur les questions de sécurité alimentaire au plan mondial.

- une extension du réseau **Global Salm-Surv** à *Listeria monocytogenes*. Global Salm-Surv (<http://www.who.int/salmsurv/en/>) fait partie des efforts de l'OMS visant à renforcer les capacités de ses États Membres en matière de surveillance et de contrôle des principales maladies d'origine alimentaire et à contribuer aux efforts mondiaux de confinement de la résistance antimicrobienne aux pathogènes d'origine alimentaire. Depuis 2000, les institutions et les personnels de santé humaine, les vétérinaires et les personnels des disciplines liées à l'alimentation participent aux activités du Salm-Surv, lors de formations régionales pour les microbiologistes et les épidémiologistes, l'assurance de qualité externe et les tests de référence, un groupe de discussion en ligne, et une banque de données sur le web contenant un répertoire annuel des laboratoires. Au cours des cinq prochaines années, les plans Global Salm-Surv visant à améliorer sa couverture régionale par de nouveaux cours de formation en Asie centrale, en Afrique orientale et australe, au Brésil et en Europe, à encourager la participation au système d'assurance qualité externe et aux projets d'intérêt régional et national, s'étendra à d'autres pathogènes d'origine alimentaire (*Campylobacter*), produira des manuels de formation en microbiologie et en épidémiologie et mettra en place des centres régionaux.

2.3.3 PULSENET EUROPE

Dans le cadre du 6^{ème} PCRD de l'Union Européenne (DG-Recherche), le Laboratoire des *Listeria* a été choisi pour coordonner un programme de surveillance européenne des souches d'origine humaine et d'origine alimentaire de *L. monocytogenes*. Ce programme de surveillance, appelé PulseNet Europe (<http://www.pulsenet-europe.org>), concerne également deux autres pathogènes des aliments : *Escherichia coli* VTEC et *Salmonella*. Ce programme fait partie du réseau européen Med-Vet-Net pour la prévention et le contrôle des zoonoses et des maladies d'origine alimentaire.

L'ouverture effective de la base de données accessible de Pulse Net a été réalisée en Octobre 2006 ainsi que celle du forum de communication de PulseNet Europe (PNE forum) utilisable en particulier en situation d'épidémie. Son management a été transféré en 2007 à l'ECDC.

Le CNRL et le CCOMS de la listériose d'origine aliementaire sont certifiés EQUAS depuis 2006, pour la macrorestriction d'ADN selon le protocole PULSENET et pour l'analyse des profils de macrorestriction d'ADN par le logiciel Bionumerics.

→ En 2007, le CNRL a effectué ses analyses de macrorestriction d'ADN sous certificat EQUAS pour l'assurance-qualité de ces profils de macrorestriction d'ADN génomique de *L. monocytogenes* au moyen des enzymes de restriction *AscI* et *ApaI*. Le CCOMS de la listériose d'origine alimentaire a proposé au comité Européen de Normalisation en analyses des aliments de normaliser les méthodes Pulsenet Europe pour *L. monocytogenes*.

2.3.4 EC RAPID ALERT SYSTEM FOR FOOD AND FEED (RASFF)

Le réseau RASFF de l'Union européenne a été mis en place pour fournir aux autorités de contrôle un outil efficace d'échange d'informations sur les mesures prises pour garantir la sécurité alimentaire. Dès lors qu'un membre de ce réseau dispose d'informations relatives à l'existence d'un risque sérieux direct ou indirect pour la santé humaine, il communique immédiatement ces informations par une notification d'alerte (Une notification d'alerte est émise lorsque les produits alimentaires présentant un risque se trouvent sur le marché et qu'une action immédiate est nécessaire) ou notification informative (Ces alertes sont déclenchées par l'État membre qui détecte le problème et qui a initié les mesures adéquates, telles que le retrait ou le refus de produits alimentaires) à la Commission aux termes du RASFF. La Commission transmet immédiatement ces informations aux membres du réseau.

Contrairement aux autres membres (DGAI, DGCCRF, InVS) de la Cellule *Listeria*, le CNRL/CCOMS n'est pas destinataire des informations du réseau RASFF de l'Union européenne. Ce point sera examiné en 2008 avec la Cellule *Listeria* pour renforcer l'exhaustivité en termes d'informations et la réactivité du CNRL.

3 ACTIVITES DE SURVEILLANCE

3.1 DONNEES DE LA SURVEILLANCE MICROBIOLOGIQUE DE LA LISTERIOSE HUMAINE

3.1.1 CAS DE LISTERIOSE EN FRANCE

3.1.1.1 DEFINITION DE CAS

Les cas de listériose sont classés en listériose materno-néonatale et listériose non materno-néonatale selon les définitions suivantes :

- Un **cas de listériose materno-néonatale** est un cas où *L. monocytogenes* est isolée d'une culture d'un site, le plus souvent normalement stérile, de la femme enceinte, des prélèvements périnataux effectués à la naissance ou du nouveau-né (≤ 28 jours). La mère et l'enfant comptant alors pour un seul cas.
- Un **cas de listériose non materno-néonatale** est un cas de listériose où une souche de *L. monocytogenes* est isolée d'un site, le plus souvent normalement stérile, chez un adulte (femme enceinte exclue) ou plus rarement chez un enfant (> 28 jours).

Un cas sporadique est un cas non-épidémique. Lorsqu'il y a émergence d'un clone, c'est à dire augmentation du nombre de cas dus à des souches présentant les mêmes caractéristiques (sérovar ou groupe PCR et profils de macrorestriction d'ADN), suffisante pour nécessiter une information médiatique des populations à risque¹, les cas sont dits épidémiques. La notion de cas sporadiques définie ici, englobe donc nécessairement des cas groupés en petit nombre pour lesquels des investigations épidémiologiques et microbiologiques ont été entreprises, sans qu'un lien entre les cas soit établi ou lorsqu'un lien a été suspecté, la preuve d'une source commune n'ayant pas été formellement établie.

Le système de surveillance de la listériose du CNRL est basé sur l'étude des souches adressées volontairement par les biologistes. Il s'agit donc d'un système passif, non-exhaustif. La présente étude concerne tous les cas pour lesquels le prélèvement positif à *L. monocytogenes* a été réalisé en 2007 et la souche caractérisée par le CNRL. Ceci inclut donc les souches reçues au cours du premier trimestre 2008 compte tenu des retards dans l'envoi des souches au CNR.

¹ Définition arbitraire pouvant être modifiée après discussion avec l'InVS et la DGS.

→ En 2007, l'INVS en réunion de la Cellule *Listeria* a évoqué la possibilité d'étendre la définition de la listériose aux résultats positifs de PCR pour *L. monocytogenes* dans les LCR sans isolement du microorganisme, si les performances des méthodes et leurs fiabilités étaient connues.

3.1.2 ANALYSE GLOBALE DES CAS DE LISTERIOSE

Nombre total de cas

En 2007, le CNRL a reçu 359 souches représentant 316 cas (hors 43 doublons) de suspicion de listériose.

Pour 4 cas (1,3 % contre 1,4% en 2006 soit 4 cas), le CNRL n'a pas confirmé le diagnostic de listériose. Il s'agissait dans un cas d'une souche isolée d'hémoculture, dans un cas d'une souche isolée d'une coproculture, dans un cas d'une souche isolée d'un prélèvement urinaire et dans un cas d'une souche isolée de liquide gastrique chez un nouveau-né de Guyane. Pour 5 autres cas, le CNRL a identifié non pas une listériose mais une infection par *L. ivanovii* *subsp. ivanovii* (Cf. 3.3.1.1.). Pour dans 1 cas, le CNRL n'a pu réaliser l'analyse suite à l'envoi d'un tube cassé. Il s'agit donc de 10 cas dont le diagnostic de listériose à *L. monocytogenes* n'est pas confirmé.

En 2007, aucun échantillon biologique (LCR, Sérum) adressé au CNRL dans le cadre du diagnostic de suspicion de listériose n'a été analysé par le CNRL (Ces prélèvements ont été transférés au laboratoire de microbiologie de l'hôpital Necker-Enfants Malades).

Au total, le CNR retient donc 306 cas de listériose pour l'année 2007. Ces cas étaient répartis en 299 cas en provenance de France métropolitaine et 7 cas en provenance des Départements et Territoire d'Outre-Mer (DOM-TOM) [Guyane (1), Martinique (1), Nouvelle-Calédonie (1), Réunion (3)]. Les 7 cas des DOM-TOM seront analysés dans le chapitre 3.1.4.

→ Il conviendrait que des règles soient établies en matière d'investigation de cas de listériose survenant à des ressortissants français qui se trouvaient hors du territoire national.

Taux exhaustivité

La surveillance de la listériose en France est fondée sur la complémentarité de 2 sources de recensement des cas : la notification des cas aux DDASS avec centralisation des informations à l'InVS (maladie à Déclaration Obligatoire) et la centralisation du recueil des souches au CNRL sur la base du volontariat d'un réseau de microbiologistes. En 2007, un point a été effectué chaque trimestre entre les déclarations obligatoires envoyées par les laboratoires à l'InVS et les souches reçues au CNRL afin de maintenir un taux élevé d'exhaustivité et mobiliser les DASS pour la récupération des souches dans un but épidémiologique.

La comparaison des 2 systèmes en 2007 montre **un taux d'exhaustivité de 98 %** (comme en 2006) de l'envoi des souches par rapport à l'ensemble des cas recensés par les 2 systèmes. Dans 9 cas, la souche n'avait pas été envoyée au CNR en 2007. Soit elle n'a pas été conservée par le laboratoire (6), soit elle n'était plus viable (1), soit nous attendons toujours l'envoi (2).

A noter que la relance des biologistes nous a permis de récupérer 6 souches dont la plus récente a été reçue en Février 2008.

Laboratoires expéditeurs

Parmi les 316 souches qui ont été envoyées pour suspicion de listériose, 274 (87 %) proviennent de laboratoires de centres hospitaliers et 42 (13 %) de laboratoires privés. Ces proportions sont identiques à celles de 2005 et de 2006 malgré l'augmentation du nombre de souches d'origine humaine.

- Le délai moyen entre la date du prélèvement ayant abouti à l'isolement de la souche et la réception de cette souche au CNRL a été de 10,3 jours (contre 11,5 jours en 2006, 10 jours en 2005 et 9 jours en 2004) [compris entre 1 et 222 jours] (Figure 3). Le délai médian est de 8,5 contre 9 jours en 2006 et 6,5 jours en 2005.

Ce délai entre l'isolement de la souche et la réception de la souche au CNRL est lié aux difficultés croissantes du transport des souches ou des produits biologiques vers les CNRs, surtout par le réseau postal. Pour éviter son allongement, le réseau CNRL-INV-S-DDASS effectue les relances nécessaires de façon coordonnée pour l'envoi des souches par nos correspondants. L'amélioration constatée en 2007 provient d'une négociation avec un transporteur d'échantillons de laboratoire qui a bien voulu créer un service de collecte des souches humaines vers les CNRs de l'Institut Pasteur. Cependant ce transporteur n'a pas comme client l'ensemble des laboratoires d'analyses médicales français.

- Le délai moyen entre la réception de la souche au CNRL et l'envoi du rapport d'essai (contenant les résultats d'identification biochimique et la détermination du sérovar ou du groupe PCR) a été de 9 jours en 2007 contre 9,5 en 2006 [compris entre 1 et 25 jours (Figure 4)]. Le délai moyen était de 10 jours. Le délai médian est de 10,5 jours comme en 2005 et 2006 mais plus rapide par rapport aux années antérieures. La sérotypie ayant été remplacée en Février 2005 par le groupage par PCR multiplex, il était attendu que ce délai diminue. Compte tenu du protocole mis en place par le CNRL et du jour de la semaine où la souche est reçue au CNRL, le délai maximal jugé « normal », entre la réception de la souche et l'envoi du compte-rendu d'analyses est de 12 jours. Le respect de ces délais est devenu une des priorités du CNR. Pour 90 % des souches comme en 2006 (contre 85 % en 2005), le compte-rendu d'analyses a été envoyé dans des délais normaux. Les dépassements du délai maximal sont dus dans la majorité des cas à des difficultés dans la caractérisation de certaines souches et au calendrier des jours ouvrés.

➔ En cas d'urgence ou de demandes de la Cellule *Listeria*, le délai moyen en 2007 entre la réception de la souche au CNRL et la communication des résultats à la Cellule *Listeria* est de 2 jours pour le résultat de groupage PCR effectué sur le premier quadrant de l'isolement de la souche réceptionnée contre 3 jours en routine et de 5 jours pour les résultats de macrorestriction d'ADN contre 12 jours en routine.

L'ensemble de ces résultats montrent la stabilité du réseau de microbiologistes constitué par le CNRL ainsi que la prise de conscience par les biologistes des enjeux de santé publique ainsi que de leur place essentielle dans la surveillance microbiologique de la listériose basée sur le recueil des données issues de leur laboratoire. Cependant, la question du coût de l'envoi des souches est une question transversale au plus grand nombre de CNR et qui nécessite une réflexion de fond. Dans certains cas, cette question apparaît pouvoir devenir un frein à l'envoi systématique en temps réel des souches.

Figure 3 : Distribution des souches d'origine humaine isolées en 2007 selon le délai entre le prélèvement et la réception au CNR (en rouge, la médiane).

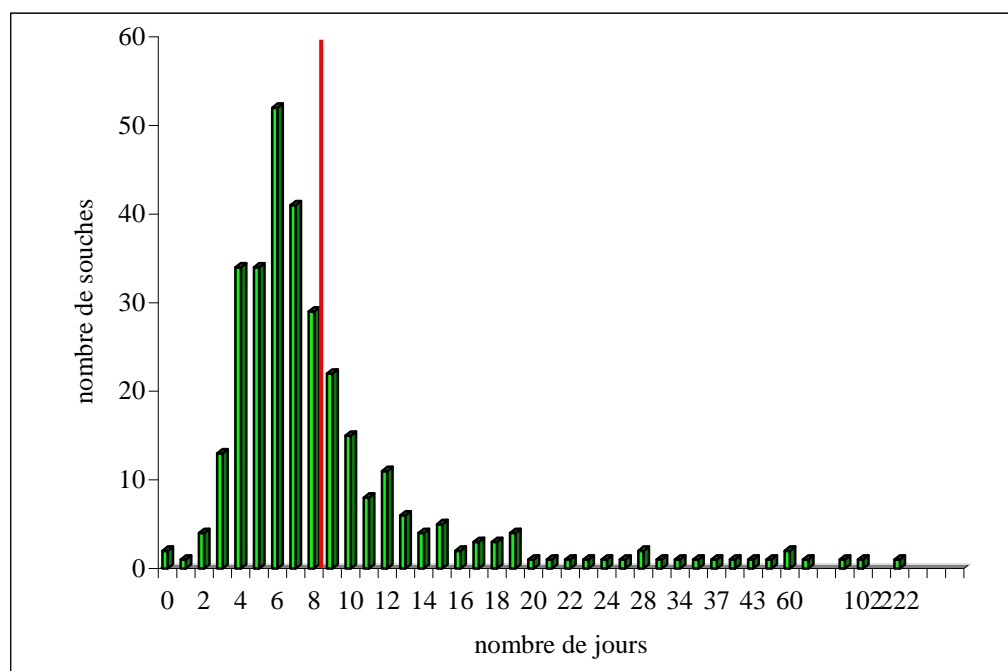
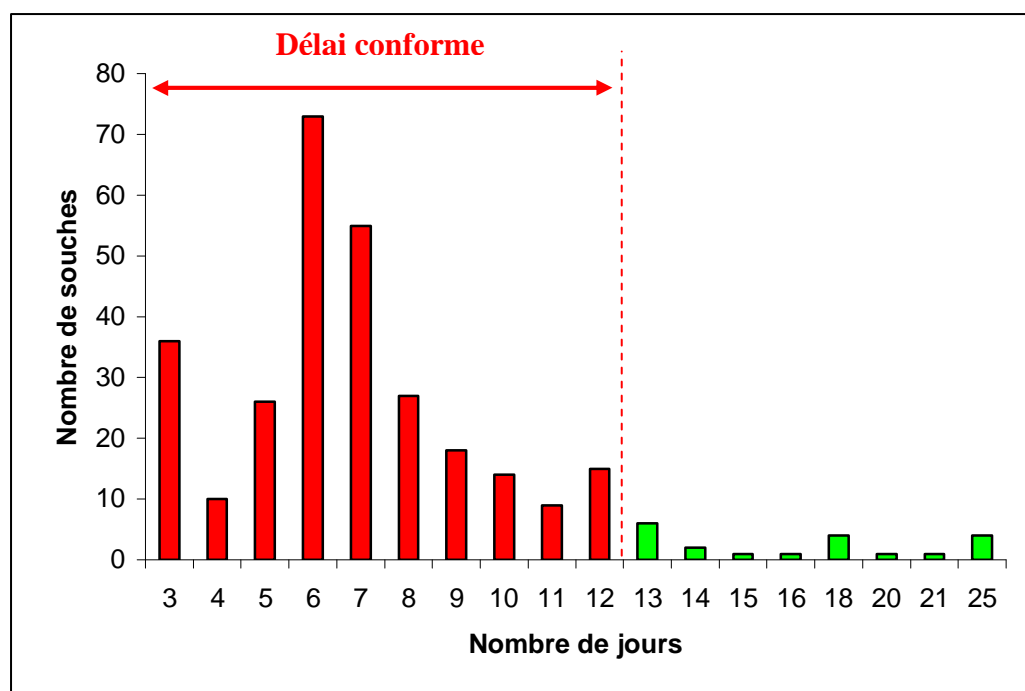


Figure 4 : Distribution des souches isolées en 2007 selon le délai entre la réception de la souche au CNR et l'envoi du rapport d'essai. En rouge, le délai conforme aux procédures du CNRL.



3.1.3 CAS DE LISTERIOSE EN FRANCE METROPOLITAINE

Le nombre de cas recensés en 2007 par le CNR provenant de la France métropolitaine est de 299. Comme dans de nombreux pays européens, le nombre de cas de listériose diagnostiqués en 2007 est en augmentation de 9 % par rapport à 2006 (272 cas) sans qu'aucun épisode épidémique n'ait été détecté (Figure 5). En 2007, le taux d'incidence moyen des cas de listériose sporadique était de 4,8 cas par million d'habitants (contre 4,7 cas par million d'habitants en 2006). Le nombre de souches associées à un signalement est constant 106 (35%) en 2007 équivalent à 2006 pour un nombre de signalement identique. Cependant, aucune source commune n'a pu être identifiée pour ces 16 signalements.

3.1.3.1 DISTRIBUTION TEMPORELLE DES CAS

La distribution mensuelle et trimestrielle des cas sporadiques est représentée dans les figures 6 et 7.

Le plus grand nombre de cas a été observé durant le troisième trimestre et notamment pour les mois d'Août (30 cas) et de Septembre (34 cas).

Par ailleurs, le nombre de cas observé était important en Février en 2006 (29 cas) alors qu'il est le plus faible (11 cas) en 2007. La distribution temporelle des cas sur le premier semestre 2007 a évolué par rapport à l'année 2006.

En conclusion, la distribution temporelle des cas est variable d'une année à l'autre au rythme des épisodes de cas groupés. Il n'existe pas de véritable variation saisonnière comme pour d'autres microorganismes pathogènes véhiculés par les aliments. Cependant, il est à noter que le

troisième trimestre est associé chaque année à un nombre plus important de cas diagnostiqués notamment durant le mois d’Août. Comme les données européennes le signalent, un certain niveau de saisonnalité est observable sur le second semestre de l’année.

Figure 5 : Nombre annuel de cas de listériose en France métropolitaine depuis 1987.

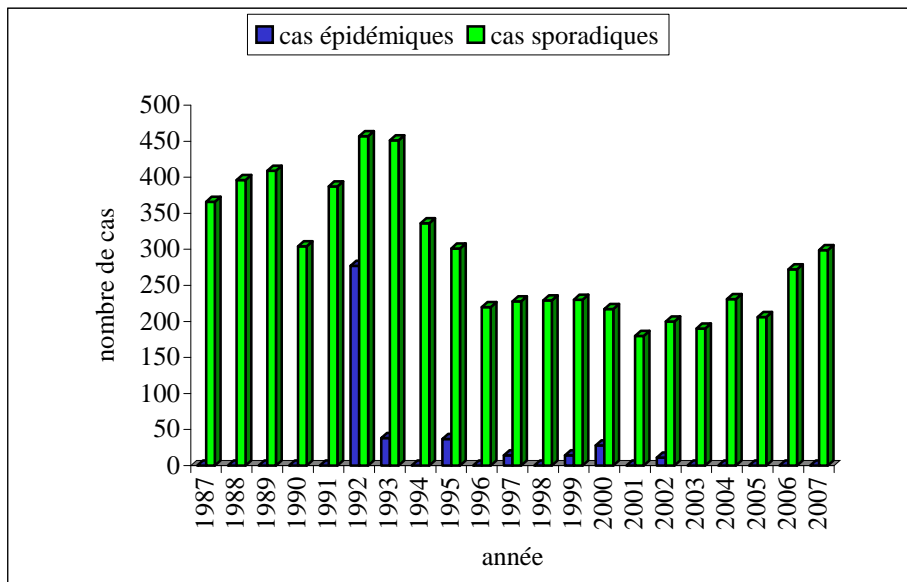


Figure 6 : Distribution mensuelle des cas sporadiques de listériose en France métropolitaine en 2007.

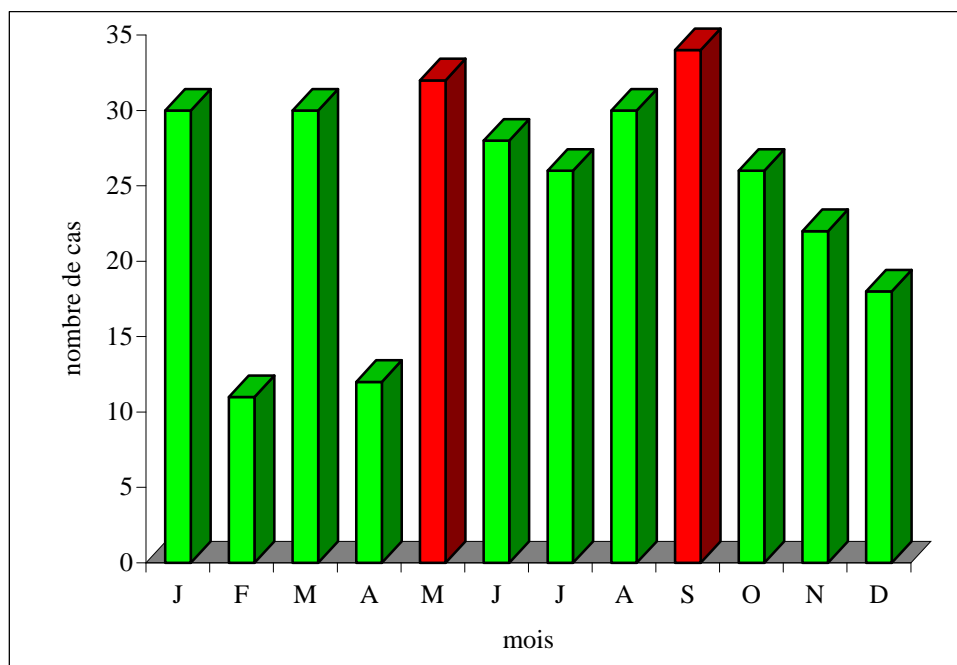


Figure 7 : Distribution trimestrielle des cas sporadiques de listériose en France métropolitaine en 2007.

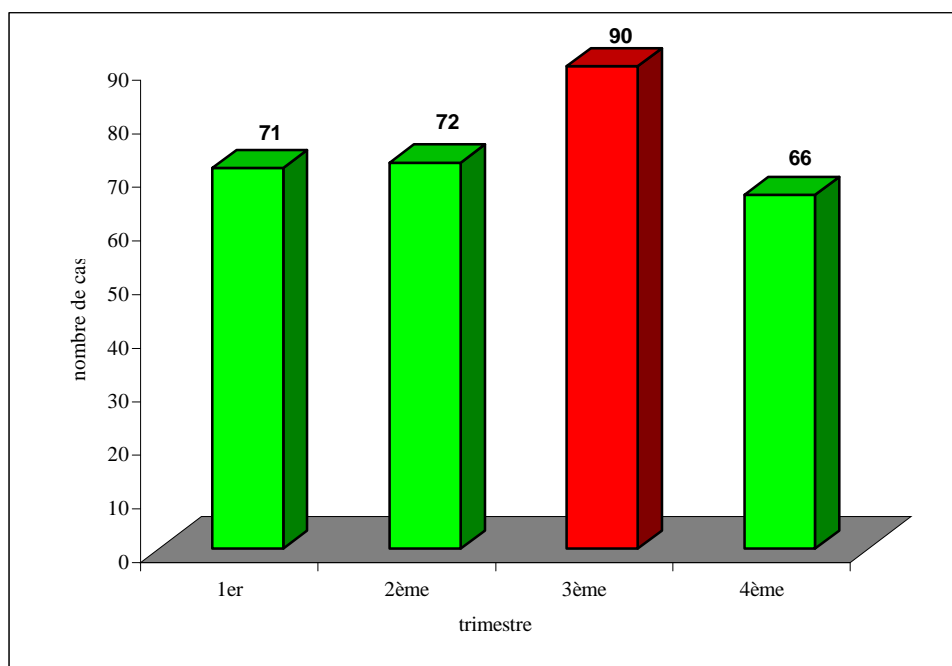
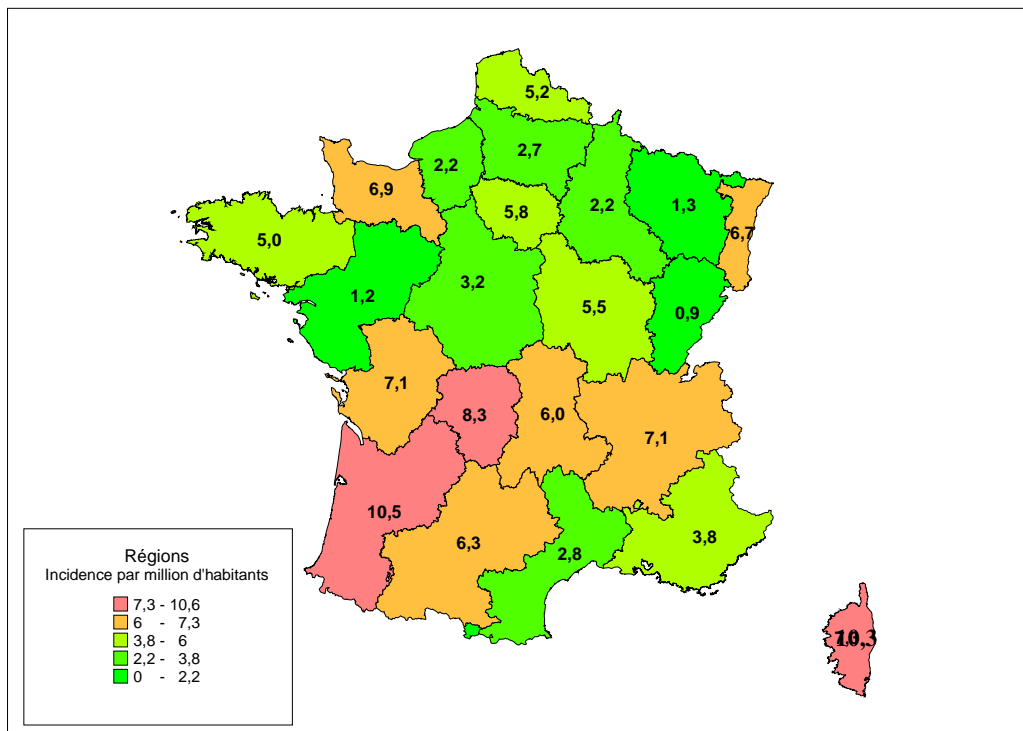


Figure 8 : Incidence régionale des cas sporadiques de listériose en 2007.



3.1.3.2 DISTRIBUTION GEOGRAPHIQUE DES CAS

La distribution géographique du nombre de cas et des incidences est représentée dans les figures 8, 9, 10 et le tableau 4. Les chiffres d'incidence sont exprimés en cas par million d'habitants et sont calculés à partir des chiffres de population donnés par l'INSEE.

Par région (Figure 8)

- Les régions caractérisées par les incidences les plus élevées sont la Corse (10,9/10⁶), l'Aquitaine (10,5/10⁶) et le Limousin (8,3/10⁶).
- Les régions caractérisées par les incidences les plus basses sont la Lorraine (0,9/10⁶), la Franche-Comté (0,9/10⁶) et les Pays de la Loire (1,2/10⁶).
- Les régions caractérisées par le plus grand nombre de cas, en valeur absolue, sont l'Île-de-France (63), Rhône-Alpes (42) et Aquitaine (32). Les régions caractérisées par les plus faibles nombres de cas, en valeur absolue, sont la Franche-Comté (1) et la Lorraine (2).

Par département (Figures 9 et 10)

- Les départements caractérisés par les incidences les plus élevées sont la Haute-Corse (13,5/10⁶), la Lozère (13,2/10⁶) et les Landes (11,5/10⁶).

- Les départements caractérisés par les incidences les plus basses sont le Gard (1,5), le Loiret (1,6/10⁶), la Vendée (1,7/10⁶), la Marne (1,8/10⁶) et l'Eure (1,8/10⁶) et 16 départements pour lesquels l'incidence est nulle (n°04-23-39-49-52-53-54-55-60-70-72-73-88-89-90-2A).

Les départements caractérisés par les plus grands nombres de cas, en valeur absolue, sont la Gironde (15), le Nord (15), le Rhône (15) et Paris (18). Les départements caractérisés par les plus faibles nombres de cas, en valeur absolue, soit 1 cas sont : les Hautes-Alpes, l'Ardèche, les Ardennes, l'Ariège, l'Aube, l'Aude, l'Aveyron, le Cantal, la Charente, le Cher, la Côte d'or, le Doubs, l'Eure, l'Eure-et-Loir, le Gard, le Loir-et-Cher, la Haute-Loire, le Loiret, le Lot, la Lozère, la Marne, la Nièvre, l'Orne, les Hautes-Pyrénées, les Pyrénées Orientales, le Tarn-et-Garonne, le Vaucluse et la Vendée.

Il faut noter que ces disparités dans les chiffres d'incidence sont variables chaque année et qu'il n'existe pas de région ou de département statistiquement plus associé qu'un autre aux cas de listériose. Les départements non touchés en 2007 ne sont pas forcément les mêmes que ceux qui étaient épargnés en 2006. De même, les départements pour lesquels l'incidence en 2006 était élevée ne sont pas ceux constatées en 2007.

Cependant, on observe en 2007, une nette distinction en termes d'incidence entre le Nord et le Sud de la France métropolitaine. Les plus fortes incidences sont observées dans les régions et départements du sud-ouest et centre de la France par rapport à l'année 2006 (Sud et Grand Ouest) avec dans le sud-ouest des doublements d'incidence pour certains départements. Il est à souligner un doublement du nombre de cas pour la région Provence Alpes Cote d'Azur. Concernant le cas de la Corse ayant de fortes incidences en 2006, l'incidence observée de 13,5 cas par millions d'habitants est stable pour la Haute-Corse depuis 2006 mais pour un nombre relativement restreint de cas (n=3), et la Corse du Sud présente en 2007 une incidence nulle.

Ces disparités régionales pourraient correspondre à de réelles différences notamment en termes d'habitudes alimentaires comportant des risques différents en matière de listériose ou à un système de surveillance dont l'efficacité pourrait être inégalement distribuée.

Tableau 4 : Distribution régionale des cas sporadiques de listériose diagnostiqués en France métropolitaine depuis 1997.

Région	Année										
	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007
Alsace	4	7	4	5	1	4	6	6	7	8	12
Aquitaine	12	12	13	17	15	11	11	28	13	16	32
Auvergne	5	11	7	4	3	6	4	6	1	6	8
Basse-Normandie	8	9	8	6	4	8	8	6	6	2	10
Bourgogne	5	6	9	6	4	6	4	9	5	9	7
Bretagne	15	7	12	10	8	10	10	16	13	16	15
Centre	10	10	8	8	4	5	7	7	7	11	8
Champagne-Ardenne	9	5	3	3	2	3	2	4	3	7	3
Corse	0	1	3	1	0	0	0	1	2	4	3
Franche-Comté	3	4	3	4	0	2	3	2	4	2	1
Haute-Normandie	8	4	9	9	3	7	3	3	5	7	4
Ile-de-France	40	47	45	44	43	42	37	39	36	42	63
Languedoc-Roussillon	6	7	6	12	2	4	5	10	7	10	7
Limousin	3	1	3	1	6	3	2	2	1	2	6
Lorraine	12	4	0	6	8	4	10	10	11	7	2
Midi-Pyrénées	7	12	7	9	12	7	16	15	18	25	17
Nord-Pas-de-Calais	13	16	17	5	8	13	10	8	15	11	21
Pays de la Loire	16	19	16	9	7	11	7	8	9	11	4
Picardie	2	4	11	5	2	6	8	4	3	12	7
Poitou-Charentes	5	5	7	11	6	2	6	7	2	6	8
Provence-Alpes-Côte-d'Azur	16	9	13	17	16	21	15	18	16	31	19
Rhône-Alpes	26	25	24	24	19	21	13	20	18	26	42
sans information	0	1	0	0	2	0	1	0	0	0	0
Total	225	225	228	216	173	196	187	229	202	271	299

Figure 9 : Incidence départementale des cas sporadiques de listériose en 2007.

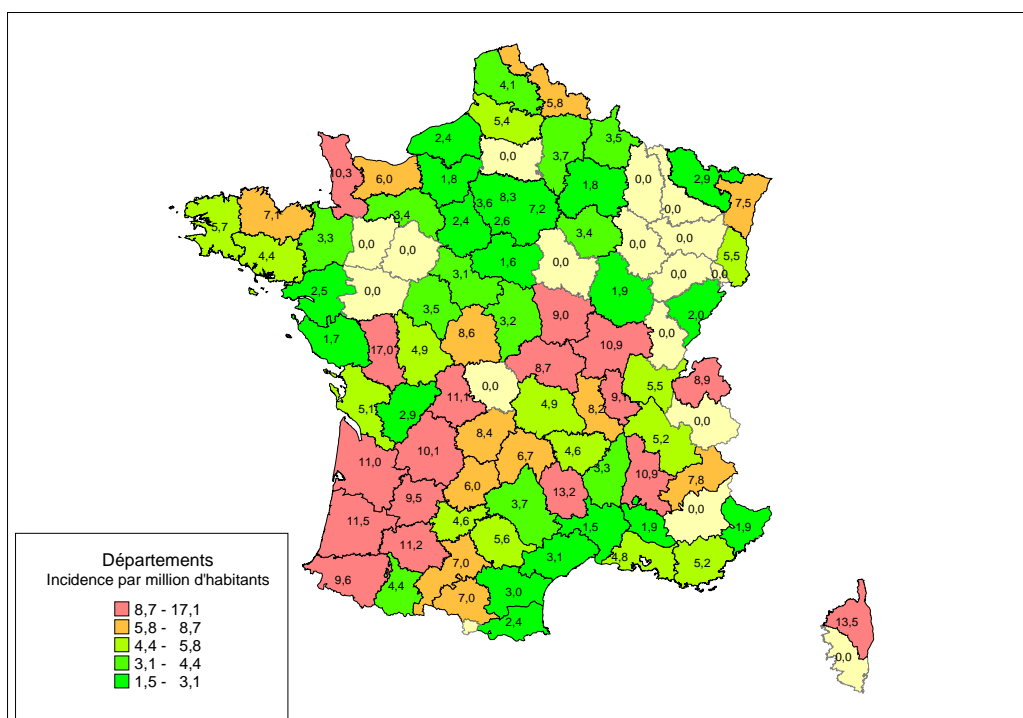
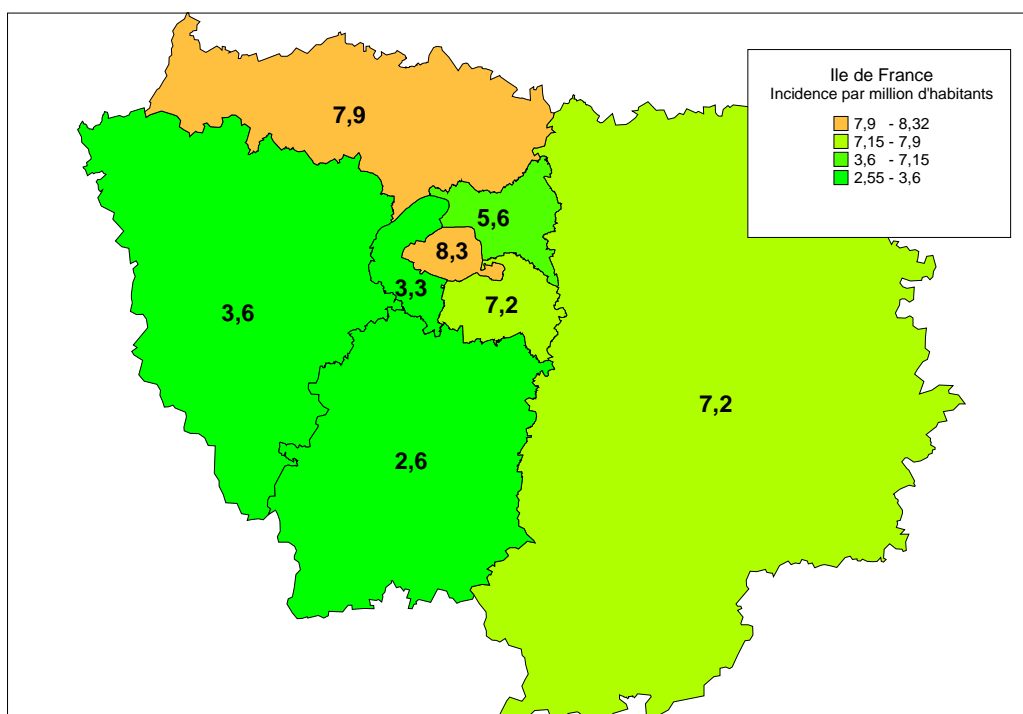


Figure 10 : Incidence départementale des cas sporadiques de listériose en Ile-de-France en 2007.



3.1.3.3 DISTRIBUTION DES CAS SELON LA FORME CLINIQUE

Les formes cliniques n'étant pas systématiquement indiquées sur la feuille de renseignements relatifs aux souches ou communiquées lors des demandes téléphoniques d'informations complémentaires, celles-ci sont parfois déduites, en conséquence, du type de prélèvement. Aussi ces données doivent-elles être analysées avec prudence.

Formes materno-néonatales

Quarante-deux formes materno-néonatales ont été enregistrées, représentant 14 % du nombre total de cas sporadiques pour 2007 (Figure 11). Ce nombre de cas en 2007 est supérieur de 35% à celui de 2006. La distribution mensuelle fait apparaître des irrégularités qui suivent le plus souvent la courbe générale des cas sporadiques (Figure 12). La distribution par région est donnée dans le tableau 5.

Formes non materno-néonatales

Deux cent cinquante-sept formes non materno-néonatales ont été enregistrées (contre 240 en 2006), soit 86 % du total des cas sporadiques pour 2007, qui se répartissent comme suit :

- 178 (60 %) septicémies/bactériémies,
- 66 (22 %) infections du système nerveux central,
- 13 (4 %) autres formes.

- **Le pourcentage d'infections du système nerveux central est en légère augmentation par rapport aux années précédentes.** Cependant, le nombre de cas en valeur absolue est quant à lui assez stable depuis 2000, entre 40 et 60 cas/an (Figures 13 et 14). **Ce sont ces formes cliniques avec les formes materno-neonatales qui ont le plus augmenté parmi le nombre de cas observé en 2007.**

→ En précision, le rapport du 3 janvier 2008 de l'étude InVS sur l'épidémiologie, l'optimisation du diagnostic et le pronostic des encéphalites infectieuses en France en 2007 a montré que sur 117 patients, dont l'exploration étiologique était terminée, 11 patients (9,5%) avaient une encéphalite listérienne.

- **Le pourcentage des formes septicémies/bactériémies est le plus élevé observé depuis 1995.** Ces formes sont en augmentation et se rapprochent du nombre de cas de 1992 à 1995. Ce sont ces formes cliniques qui avaient déjà le plus contribué à l'augmentation globale du nombre de cas observée en 2006.

- Les formes cliniques « autres » correspondent à des atteintes focales. Elles sont en baisse en 2007 représentant 4% (n=13) de tous les cas de listériose non materno-fœtale au lieu

de 7% (n=16) en 2006. Ces infections consistaient en : infection du liquide d'ascite (3 cas), infection sur prothèse de hanche (2 cas), anévrisme infectieux de l'aorte (1 cas), anévrisme iliaque (1 cas), abcès crosse de l'aorte (1 cas), endocardite infectieuse (1 cas), infection articulaire (1 cas), pseudo-arthrose du genou (1 cas), fistule anale (1 cas), pleurésie récidivante (1 cas).

Figure 11 : Distribution des cas sporadiques de listériose en France métropolitaine depuis 1987 selon la forme clinique.

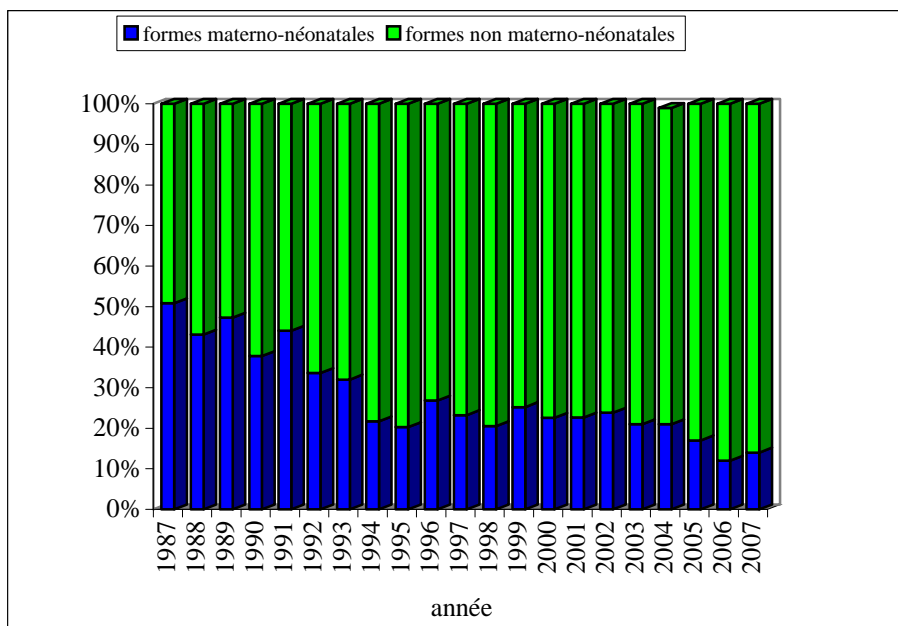


Figure 12 : Distribution mensuelle des cas sporadiques de listériose en France métropolitaine en 2007 selon la forme clinique.

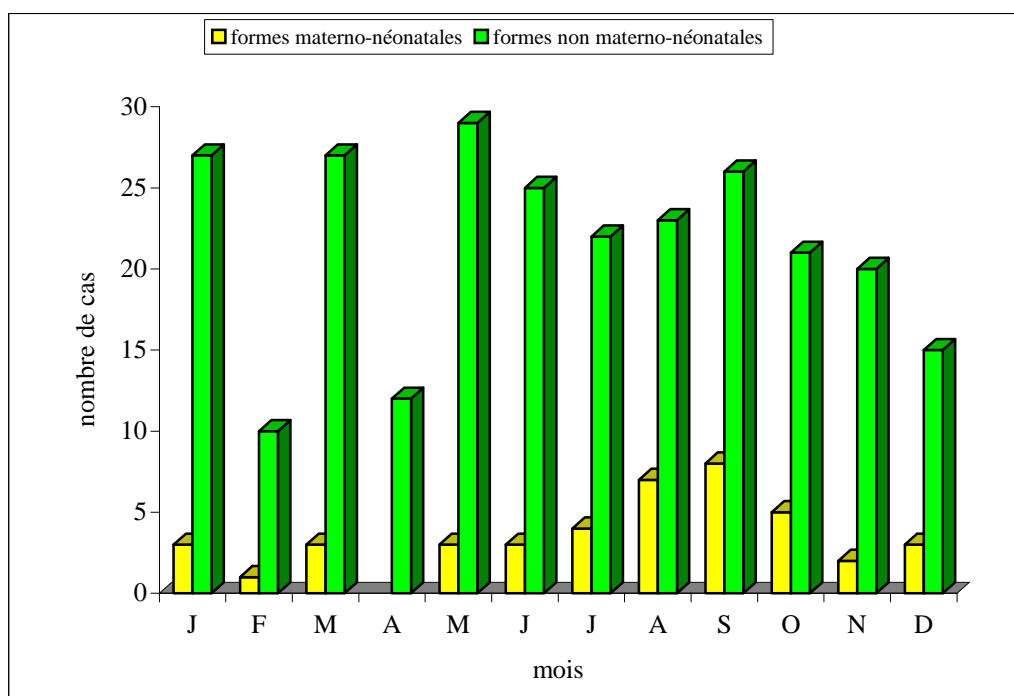


Figure 13 : Distribution des infections du système nerveux central et des bactériémies/septicémies pour les cas sporadiques de listériose en France métropolitaine depuis 1987.

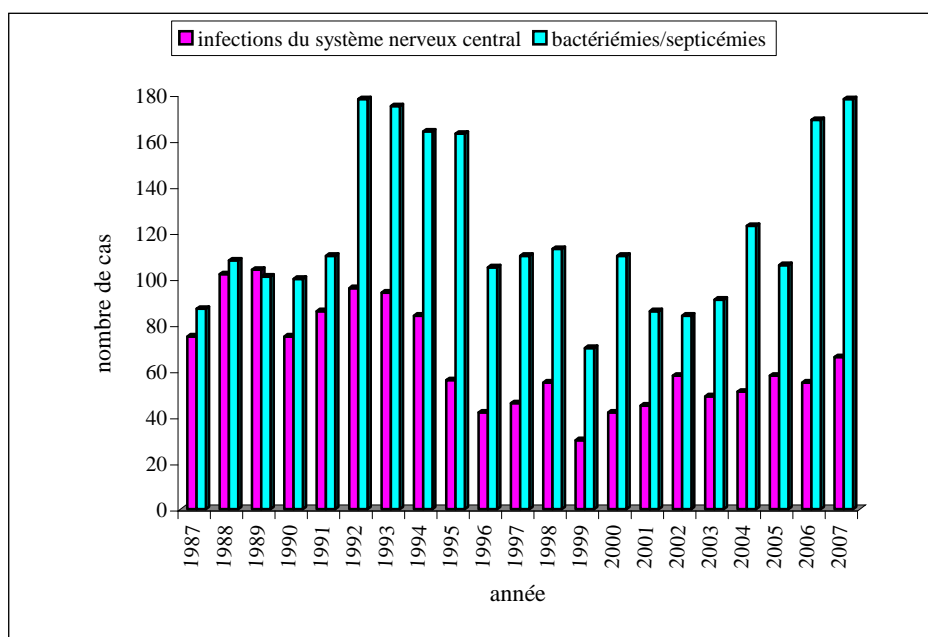
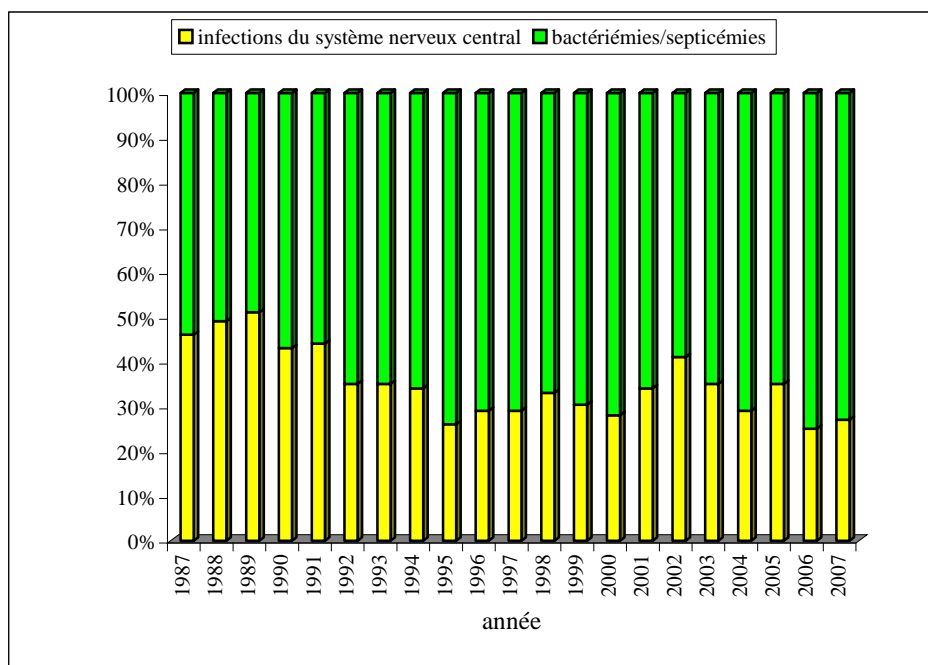


Figure 14 : Proportion des infections du système nerveux central et des bactériémies/septicémies pour les cas sporadiques de listériose en France métropolitaine depuis 1987.



Distribution régionale et temporelle

Les distributions régionale et temporelle sont données dans les tableaux 6 et 7 et les figures 11, 12 et 15.

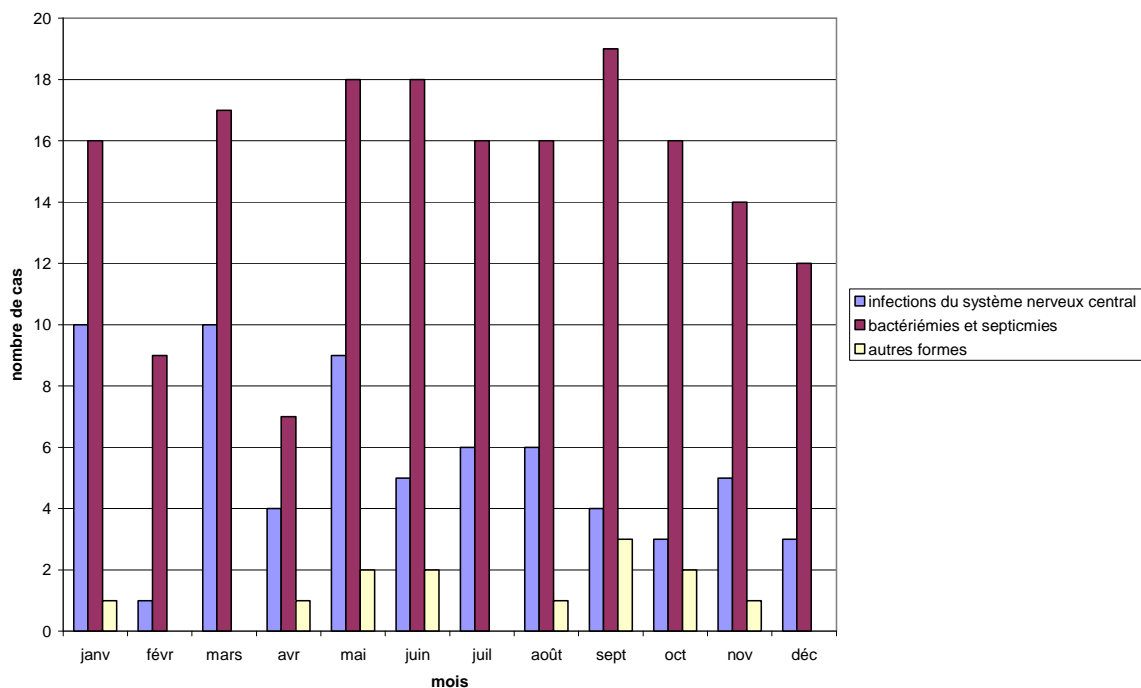
Tableau 6 : Distribution régionale des cas sporadiques de listériose en France métropolitaine en 2007 selon la forme clinique.

Région	Total	Formes materno-néonatales	Formes non materno-néonatales
Alsace	12	1	11
Aquitaine	32	3	29
Auvergne	8	1	7
Basse-Normandie	10	0	10
Bourgogne	7	0	7
Bretagne	15	2	13
Centre	8	0	8
Champagne-Ardenne	3	1	2
Corse	3	2	1
Franche-Comté	1	0	1
Haute-Normandie	4	0	4
Ile-de-France	63	13	50
Languedoc-Roussillon	7	1	6
Limousin	6	0	6
Lorraine	2	0	2
Midi-Pyrénées	17	3	14
Nord-Pas-de-Calais	21	4	17
Pays de la Loire	4	1	3
Picardie	7	0	7
Poitou-Charentes	8	0	8
Provence-Alpes-Côte-d'Azur	19	2	17
Rhône-Alpes	42	8	34
Total	299	42	257

Tableau 7 : Distribution mensuelle des formes sporadiques de listériose non materno-néonatale en France métropolitaine en 2007.

Mois	Infections du système nerveux central	Bactériémies et septicémies	Autres formes	Total
J	10	16	1	27
F	1	9	0	10
M	10	17	0	27
A	4	7	1	12
M	9	18	2	29
J	5	18	2	25
J	6	16	0	21
A	6	16	1	23
S	4	19	3	26
O	3	16	2	20
N	5	14	1	19
D	3	12	0	15
Total	66	178	13	257

Figure 15 : Distribution mensuelle des formes sporadiques de listériose non materno-néonatale en France métropolitaine en 2006.



Terrain

L'information sur l'existence ou non d'une affection sous-jacente ou concomitante était rapportée dans 257 cas (86 %). Pour 146 patients (57% des cas renseignés), une ou plusieurs affections sous-jacentes, décrites pour favoriser la listériose, étaient rapportées : cancer, cirrhose, éthylisme, diabète, dialyse, infection par le VIH, transplantation d'organe et traitement immunosuppresseur. Par ailleurs, 86 patients (43 %) ne présentaient aucune affection concomitante ou sous-jacente connue. Cependant, l'âge de la plupart de ces patients (décrit ci-dessous) était de nature à constituer un facteur de risque.

Age et sexe

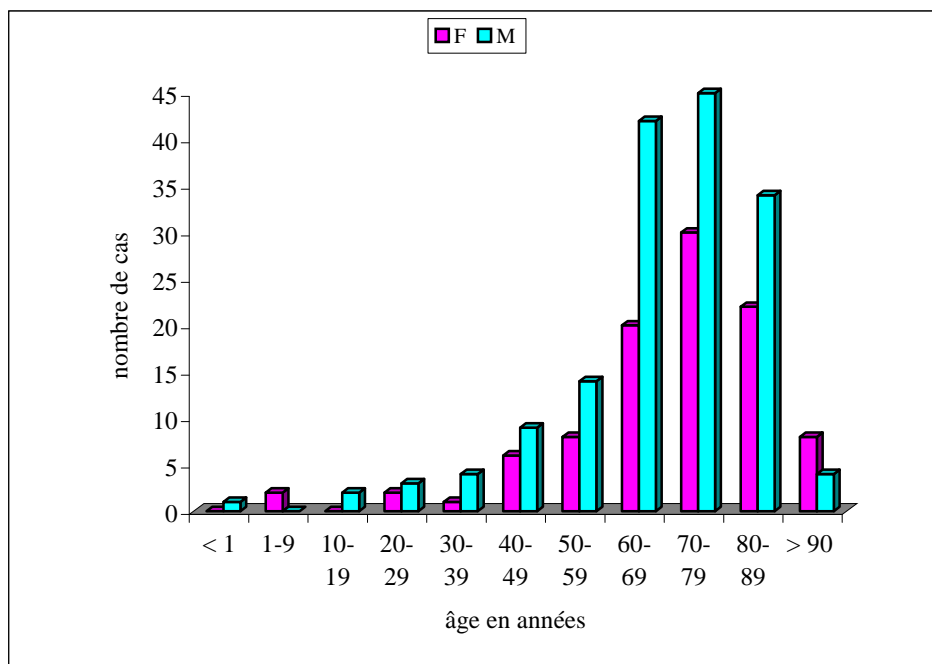
L'âge moyen était de 69 ans [<1 à 96 ans], plus élevé par rapport à ce qui était observé en 2006 (67 ans). Dans 205 cas (80 %), l'infection est survenue après 60 ans, dans 47 cas (18 %) entre 21 et 60 ans et dans 5 cas (2 %) avant 21 ans, tous sexes et formes cliniques confondus (figure 16). Le sexe ratio M/F était de 1,6. Cette relative prédominance de la listériose chez l'homme s'observe quelle que soit la forme clinique (Tableau 8 et Figure 16). Pour les personnes âgées de plus de 90 ans, on note une prédominance des cas féminins, probablement attribuable à l'espérance de vie plus élevée des femmes. Le nombre d'infections du système nerveux central varie selon la classe d'âge de 2 à 79 % de tous les cas de listériose non materno-neonatale selon

la classe d'âge et le sexe des patients alors que les septicémies et bactériémies varient quant à elles de 0 à 86 % selon ces mêmes critères (Tableau 8).

Tableau 8 : Distribution par classe d'âge, par sexe et par forme clinique des formes non materno-néonatales sporadiques en France métropolitaine en 2007.

Sexe	Classe d'âge	Total	Infections du système nerveux central	Septicémies et bactériémies	Autres formes
F	> 28 jours-20 ans	2	2	0	0
	21-60 ans	17	6	10	1
	> 60 ans	80	16	63	1
M	> 28 jours-20 ans	3	1	2	0
	21-60 ans	30	8	19	3
	> 60 ans	125	33	84	8
Total	> 28 jours-20 ans	5	3	2	0
	21-60 ans	47	14	29	4
	> 60 ans	205	49	147	9

Figure 16 : Distribution par classe d'âge et par sexe des formes sporadiques de listériose non materno-néonatale en France métropolitaine en 2007.



3.1.3.4 DISTRIBUTION DES SOUCHES SELON LE GROUPE PCR

Les résultats obtenus pour les 299 souches d'origine humaine sont les suivants :

- groupe PCR IIa (souches de sérovar 1/2a ou 3a) : 89 souches (30 %),
- groupe PCR IIb (souches de sérovar 1/2b, 3b ou 7) : 43 souches (14 %),
- groupe PCR IIc (souches de sérovar 1/2c ou 3c) : 14 souches (5 %),
- groupe PCR IVb (souches de sérovar 4b, 4d ou 4e) : 150 souches (50 %),
- groupe PCR L (souches de sérovares 4ab, 4c, 7) : 1 souche (0.5 %)
- groupe PCR nouveau (sérovar 4b) : 2 souches (<1 %)

La souche de sérovar L a été sérotypée comme une 4c.

Si les distributions parmi les 4 groupes PCR restent à peu près inchangées, il est intéressant de souligner une baisse relative des souches du groupe PCR IVb par rapport aux trois années antérieures (Figure 19) et l'augmentation continue des souches de groupe PCR IIc pourtant rarement associées à des cas humains. Cependant, comme le montre la figure 19, le groupe PCR IVb semble globalement en augmentation progressive depuis 1992.

À noter que seuls les groupes PCR IIa, IIb et IVb ont été à l'origine de signalement de cas groupés durant cette année 2007 (cf. chapitre 3.3.2.).

Distribution temporelle des groupes PCR

La distribution mensuelle des 4 principaux groupes PCR ne permet pas de mettre en évidence de saisonnalité particulière pour un groupe PCR donné (Figure 20).

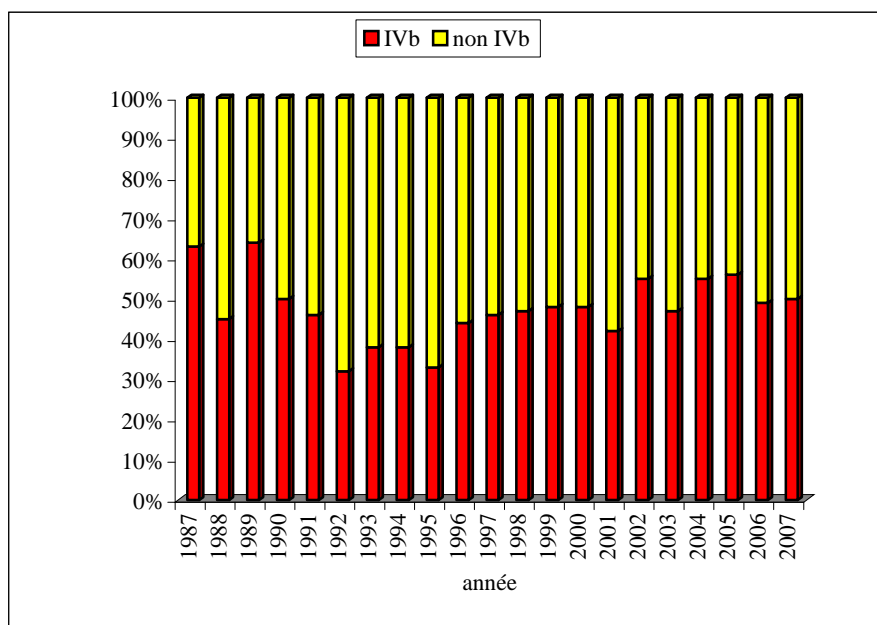
Distribution régionale des groupes PCR

La distribution régionale des souches par groupe PCR (Tableau 9) ne permet pas de mettre en évidence de distribution particulière pour un groupe de souches donné, notamment en raison de faibles effectifs considérés.

Tableau 9 : Distribution régionale des cas sporadiques de listériose en France métropolitaine en 2007 selon les groupes PCR

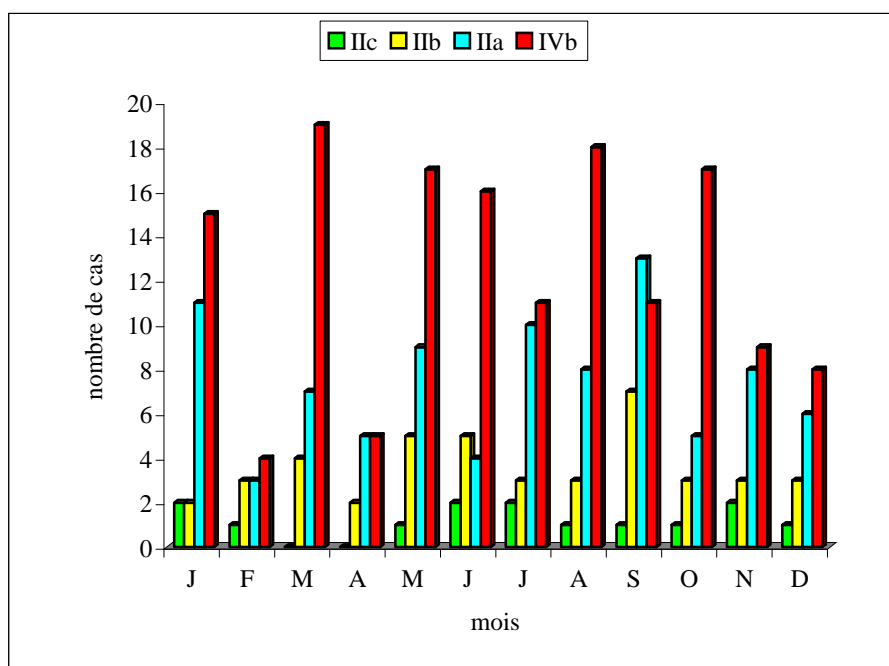
Région	Total	IIa	IIb	IIc	IVb	L	Nouveau
Alsace	12	3	0	1	8	0	0
Aquitaine	32	6	6	5	15	0	0
Auvergne	8	1	0	1	6	0	0
Basse-Normandie	10	3	2	0	5	0	0
Bourgogne	7	3	0	0	4	0	0
Bretagne	15	4	4	1	6	0	0
Centre	8	5	2	0	1	0	0
Champagne-Ardenne	3	1	0	0	2	0	0
Corse	3	0	1	0	2	0	0
Franche-Comté	1	0	0	1	0	0	0
Haute-Normandie	4	3	1	0	0	0	0
Ile-de-France	63	17	7	0	38	0	1
Languedoc-Roussillon	7	3	0	0	4	0	0
Limousin	6	0	1	1	4	0	0
Lorraine	2	1	1	0	0	0	0
Midi-Pyrénées	17	3	4	1	9	0	0
Nord-Pas-de-Calais	21	7	4	1	9	0	0
Pays de la Loire	4	2	0	0	1	0	1
Picardie	7	3	1	0	3	0	0
Poitou-Charentes	8	3	1	1	3	0	0
Provence-Alpes-Côte-d'Azur	19	5	2	0	11	1	0
Rhône-Alpes	42	16	6	1	19	0	0
Total	299	89	43	14	150	1	2

Figure 19: Distribution annuelle des souches de *L. monocytogenes* groupe PCR IVb (souches de sérovar 4b ou 4d ou 4e) et non IVb responsables des cas sporadiques de listériose en France métropolitaine depuis 1987.



Les données pour les années 1987 à 1991 inclus sont issues du CNR de Nantes.

Figure 20 : Distribution mensuelle des souches de *L. monocytogenes* des 4 principaux groupes PCR responsables de cas sporadiques de listériose en France métropolitaine en 2007.



Distribution des groupes PCR selon la forme clinique

Les souches du groupe PCR IVb (souches de sérovar 4b, 4d ou 4e) sont majoritaires, quelle que soit la forme clinique, notamment pour les formes materno-néonatales (65%) et les infections du système nerveux central (64%) (Tableau 8). Pour les formes materno-néonatales, les groupes PCR non IVb sont en évolution 32 % contre 26% en 2006.

En 2007, le groupe PCR IIc a été exclusivement associé à des bactériémies/septicémies ainsi qu'à une forme materno-néonatale et un cas d'une infection de la prothèse de hanche. En revanche, le groupe PCR IIc a été associé à aucune infection du système nerveux central contrairement à 2006.

Formes materno-néonatales

Les 42 souches à l'origine des formes materno-néonatales se répartissent comme suit :

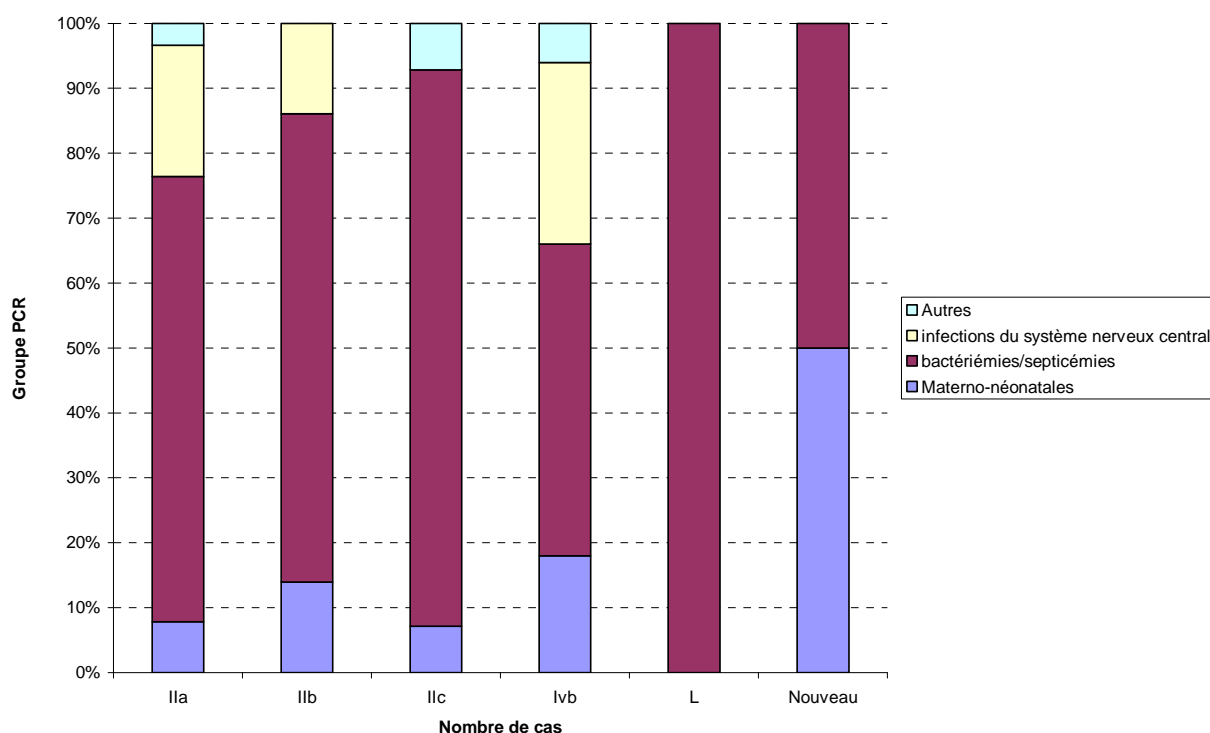
- groupe PCR IIa (souches de sérovar sérovar 1/2a ou 3a) : 7 souches (17 %),
- groupe PCR IIb (souches de sérovar 1/2b ou 3b ou 7) : 6 souches (14 %),
- groupe PCR IIc (souches de sérovar 1/2c ou 3c) : 1 souche (2 %),
- groupe PCR IVb (souches de sérovar 4b ou 4d ou 4e) : 27 souches (65 %)
- groupe PCR nouveau (sérovar 4b) : 1 souche (2 %)

Formes non materno-néonatales

Les 257 souches à l'origine des formes non materno-néonatales se répartissent comme suit :

- groupe PCR IIa (souches de sérovar 1/2a ou 3a) : 82 souches (32 %),
- groupe PCR IIb (souches de sérovar 1/2b ou 3b ou 7) : 37 souches (14 %),
- groupe PCR IIc (souche de sérovar 1/2c ou 3c) : 13 souches (5 %),
- groupe PCR IVb (souches de sérovar 4b ou 4d ou 4e) : 123 souches (48 %).
- groupe PCR nouveau (Sérovar 4b) : 2 souches (1 %)

Figure 21 : Distribution des groupes PCR des souches de *L. monocytogenes* en fonction des formes cliniques en France métropolitaine en 2007.



La distribution des groupes PCR pour les souches à l'origine des formes non materno-néonatales montre qu'il n'existe pas de relation entre le groupe PCR et l'âge du patient (Tableau 10). Les souches du groupe PCR IVb sont prédominantes quelle que soit la forme clinique (Tableau 11 et Figure 21) sauf pour les autres formes cliniques et ces dernières souches sont plus fréquemment associées à des infections du système nerveux central qu'à des bactériémies.

Tableau 10 : Distribution par groupe PCR, classe d'âge et sexe des patients, des souches de *L. monocytogenes* responsable des formes non materno-néonatales en France métropolitaine en 2007.

Sexe	Classe d'âge	Total	Groupe PCR					
			IIa	IIb	IIc	IVb	L	Nouveau
F	> 28 jours-20 ans	2	2	0	0	0	0	0
	21-60 ans	17	7	2	2	6	0	0
	> 60 ans	80	23	14	6	37	0	0
M	> 28 jours-20 ans	3	0	0	0	3	0	0
	21-60 ans	30	11	6	1	11	0	1
	> 60 ans	125	39	15	4	66	1	0
Total	> 28 jours-20 ans	5	2	0	0	3	0	0
	21-60 ans	47	18	8	3	17	0	1
	> 60 ans	205	62	29	10	103	1	0

Tableau 11 : Distribution par forme clinique et par groupe PCR des souches de *L. monocytogenes* responsables des formes materno-néonatales et non materno-néonatales en France métropolitaine en 2007.

Forme clinique	Groupe PCR						
	Total	IIa	IIb	IIc	IVb	L	Nouveau
Materno-néonatales	42	7 (8)	6 (14)	1 (7)	27 (18)	0 (0)	1 (50)
Bactériémies/Septicémies	178	61 (69)	31 (72)	12 (86)	72 (48)	1 (100)	1 (50)
Infections du système nerveux central	66	18 (20)	6 (14)	0 (0)	42 (28)	0 (0)	0 (0)
Autres	13	3 (3)	0 (0)	1 (7)	9 (6)	0 (0)	0 (0)
Total	299	89 (30)	43 (14)	14 (5)	150 (50)	1 (0,5)	2 (0,5)

3.1.4 CAS DE LISTERIOSE DANS LES DOM-TOM

En 2007, 7 cas sporadiques de listériose (contre 10 cas en 2006) ont été notifiés pour des patients résidant dans les DOM-TOM et se répartissent de la façon suivante (Tableau 12) :

Par ailleurs, dans un cas supplémentaire, le CNRL n'a pas confirmé l'identification de *L. monocytogenes* pour une souche isolée chez nouveau-né né prématurément à 24 semaines d'aménorrhée en Guyane.

Tableau 12 : Distribution par forme clinique et groupe PCR des souches de *L. monocytogenes* isolées des cas provenant des DOM-TOM en 2007.

DOM/TOM Formes cliniques	Nombre	Groupe PCR			
		IIa	IIb	IIc	IVb
Nouvelle-Calédonie Formes materno-néonatales	1		1		
Martinique Bactériémies/Septicémies	1	1			
Guyane Infections du système nerveux central	1				1
Bactériémies/Septicémies	1				1
Ile de la réunion Formes materno-néonatales	1				1
Bactériémies/Septicémies	1				1
Infections du système nerveux central	1				1
TOTAL	7	1	1	0	5

La répartition relative par séro-groupe PCR est sensiblement identique à celle observées pour les cas de France métropolitaine avec une prédominance de souches appartenant au groupe IVb.

La répartition des formes cliniques est la suivante :

- formes materno-néonatales : 29% (contre 40 % en 2006)
- infections du système nerveux central : 29% (contre 10 % en 2006)
- bactériémies/septicémies : 42%. (contre 50 % en 2006)

Cette répartition diffère de celle de 2006 par un abaissement du nombre de formes materno-néonatale et une augmentation des infections du système nerveux central.

3.1.5 ETUDE DE LA RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES

L'étude de la résistance aux antibiotiques des souches de *L. monocytogenes* d'origine humaine a été réalisée en parallèle de leur caractérisation au fur et à mesure de l'année 2007 (cf. chapitre 2.1.). Chaque souche présentant un profil inhabituel ou de sensibilité diminuée a été adressée au CNR des agents antimicrobiens (Institut Pasteur) pour confirmation et détermination du mécanisme de résistance.

β-lactamines

Toutes les souches étaient sensibles à la pénicilline, à l'ampicilline, à l'amoxicilline et à l'imipénème. Cependant, plusieurs souches montrent une sensibilité diminuée à la pénicilline. Cependant, la pénicilline G n'entre pas dans la stratégie thérapeutique actuelle de la listériose.

Aminosides

Parmi les souches d'origine humaine, le CNRL avait détecté 3 souches de sensibilité inhabituelle à la streptomycine utilisée dans cette étude comme marqueur de résistances associées. Le CNR des agents antibactériens n'a pas confirmé la présence d'une AAD6 responsable de cette résistance, pour ces 3 souches. Néanmoins, aucune souche isolée en 2007, n'est résistante à la gentamicine classiquement utilisée dans le schéma thérapeutique de référence des listérioses.

Fluoroquinolones

En 2007, 9 souches ont présenté un profil de sensibilité diminuée à la ciprofloxacine. Dans 4 cas le CNR des agents antibactériens a confirmé la présence de mutations dans la région QRDR soit dans l'ADN gyrase soit dans la topoisomérase IV. Ce mécanisme de résistance est responsable de CMI intermédiaires aux fluoroquinolones mais pas d'une vraie résistance. Pour aucune des souches de 2007, il n'a été détecté de mécanisme d'efflux (pompes Lde), précédemment décrit par Godreuil et al en 2004.

Autres molécules:

Une souche transmise au CNR des agents antimicrobiens a été confirmée résistante à la tétracycline. Ce profil de résistance est expliqué par la détection des gènes *tetS* et *tetM*, déjà décrits chez *L. monocytogenes* conférant la résistance croisée à la tétracycline et à la minocycline.

Deux souches qui présentaient une sensibilité diminuée au triméthoprim ont été transmises au CNR des agents antimicrobiens. Pour aucune de ces 2 souches, la résistance au triméthoprim n'a été confirmée.

Enfin, aucune souche n'est résistante au linézolide, au chloramphénicol, à la rifampicine, à l'acide fusidique et à la vancomycine.

Au final, *L. monocytogenes* est une bactérie pour laquelle il est certes décrit des résistances acquises à certains antibiotiques d'intérêt clinique mais ceci reste rare. *L. monocytogenes* est toujours sensible à l'amoxicilline et à la gentamicine qui constituent actuellement le traitement de référence des listérioses. Par ailleurs, il n'a pas été décrit de souche résistante au triméthoprim au cours de l'année 2007. Cet antibiotique constituant une alternative thérapeutique souvent utilisée en cas d'échec ou d'intolérance aux β-lactamines, il convient de surveiller attentivement l'incidence annuelle de telles souches résistantes.

3.1.5.1 TYPAGE MOLECULAIRE DES SOUCHES PAR MACRORESTRICTION D'ADN

Les souches sont également systématiquement caractérisées par leurs profils de macrorestriction d'ADN par les 2 enzymes de restriction *AscI* et *ApaI*, selon le protocole modifié du CDC (Graves & Swaminathan, 2001).

→ L'utilisation d'un troisième enzyme de restriction *SmaI* permet d'affiner la comparaison des souches pour attribuer un numéro de nomenclature en cas de profils similaires à une bande près pour le profil d'un des deux enzymes *AscI* ou *ApaI*. Cette prestation est faite systématiquement en cas de doute ou à la demande de l'INVS ou pour appliquer la nouvelle définition de la notification des signalements. En 2007, cette troisième enzyme a été utilisée plus fréquemment que dans les années antérieures, ce qui représente un surcoût substantiel pour le CNRL qui fonctionne à budget constant depuis ces deux dernières années.

Le système d'électrophorèse en champ pulsé utilisé depuis août 1999 est le système CHEF. Les signalements sont faits sur la base des résultats de groupage par PCR et des profils de macrorestriction d'ADN. Les résultats du typage moléculaire pour les souches d'origine humaine par macrorestriction d'ADN en champ pulsé sont uniquement envoyés à la Cellule *Listeria* dans le cadre de la surveillance.

Le CNR dispose d'un système pour l'analyse informatique des profils de macrorestriction d'ADN, effectif depuis 2005 mais utilisé en routine pour la surveillance microbiologique de la listériose depuis 2006 (cf. chapitre 2.2.2.). Ce système informatique remplace la surveillance effectuée à l'œil nu qui devenait ingérable.

3.2 CARACTERISATION DES SOUCHES D'ORIGINE NON HUMAINE

Il est important de rappeler que l'analyse des données de caractérisation des souches d'origine non humaine présentée dans ce chapitre n'est que le reflet des souches reçues au CNRL. Ce bilan ne saurait concerner l'ensemble des souches isolées des aliments en France.

En effet, si les souches isolées lors de contrôles sanitaires (Alertes de la Direction Générale de l'Alimentation (DGAl) et de la Répression des Fraudes (RF), et investigations autour de cas humain) sont systématiquement adressées au CNRL, en dehors de ce contexte chaque professionnel de l'industrie agroalimentaire (laboratoires privés ou public) est libre d'envoyer ou non ses souches pour leur caractérisation. Dans ce cas, ces professionnels peuvent choisir de les expédier soit au CNRL soit au LNR.

3.2.1 ANALYSE GENERALE

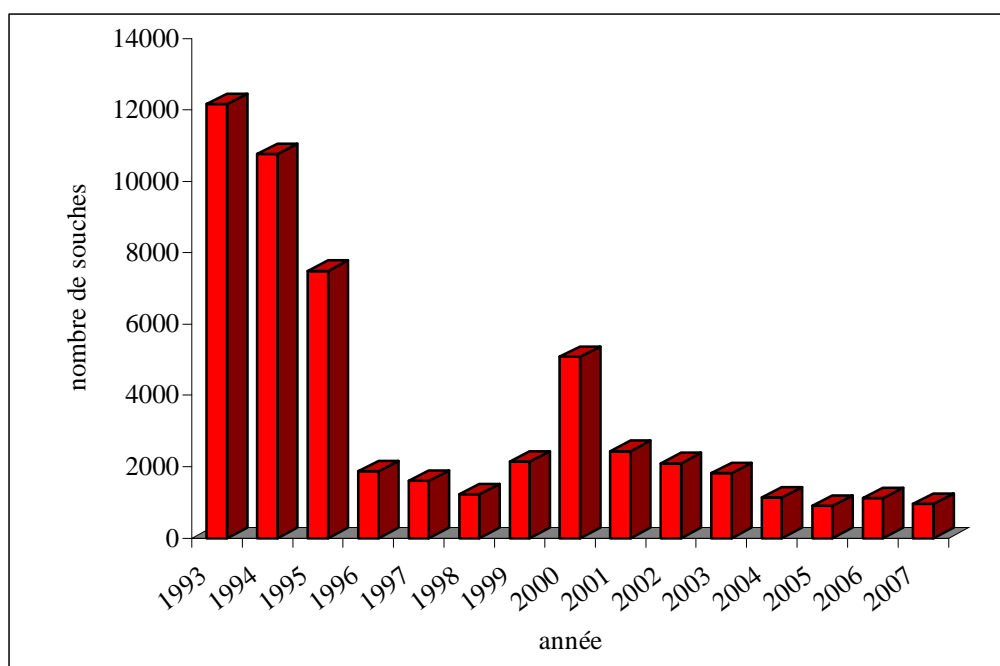
En 2007, 953 souches d'origine non humaine ont été adressées au CNRL par des laboratoires français, soit une diminution de 14% par rapport à 2006 (Figure 22). Cette baisse est explicable par l'envoi de souches non humaines au Laboratoire National de Référence de *Listeria monocytogenes* ou d'autres laboratoires spécialisés (IFIP, Maisons-Alfort) et au coût de l'identification si ces souches non humaines ne rentrent pas dans un schéma d'alerte sanitaire ou produit.

La plupart de ces laboratoires utilisent des méthodes normalisées internationalement reconnues ou des méthodes alternatives validées pour la détection et l'identification des espèces de *Listeria*. Ainsi, 97% des souches envoyées correspondent à l'espèce *L. monocytogenes*, seule espèce qui requiert une caractérisation plus poussée et qui soit mentionnée dans les réglementations de sécurité sanitaire des aliments et de l'environnement.

Cette activité consiste principalement à caractériser les souches isolées d'aliments ou de leur environnement, en particulier les souches de *L. monocytogenes* pour :

- constituer une banque de données qui permet éventuellement d'orienter les investigations en début d'épidémie,
- participer à l'identification du véhicule alimentaire lors d'épidémies,
- comparer les souches cliniques aux souches alimentaires et tenter d'en identifier les caractéristiques respectives.

Figure 22: Nombre annuel de souches d'origine non-humaine adressées par des laboratoires français depuis 1993.



La répartition des souches suivant la catégorie de laboratoire était la suivante :

- Laboratoires Vétérinaires Départementaux (LVD) : 293 souches (31 %),
- Laboratoires privés d'hygiène alimentaire : 583 souches (61 %),
- Laboratoires Interrégionaux de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes : 72 souches (8 %),
- Laboratoires hospitaliers d'hygiène : 3 souches (<1 %),
- Collection de microorganismes : 2 souches (<1 %).

L'origine des souches était la suivante :

- souches isolées d'aliments : 787 souches (83 %),
- souches isolées de l'environnement : 100 souches (10 %),
- souches sans information : 19 souches (2 %),
- souches adressées dans le cadre de travaux de recherche : 33 souches (3 %),
- souches adressées par des collections : 5 souches (<1 %)
- souches isolées chez l'animal : 9 souches (1 %).

Les souches sans information sont des souches réceptionnées de laboratoires privés d'analyses pour effectuer la caractérisation des souches. Cette expertise est alors facturée au laboratoire demandeur. Cependant, le CNRL fait rentrer les données de caractérisation dans la surveillance

nationale si le client/laboratoire demandeur l'autorise. En cas de problème de santé publique pouvant être reliés à ces souches, le CNRL se réserve le droit, après avoir prévenu son client, de demander un complément d'informations sur les souches qui seront transmises le cas échéant aux autorités sanitaires.

Les souches adressées dans le cadre de travaux de recherche correspondent à des souches virulentes et hypovirulentes de *L. monocytogenes* provenant de l'INRA UR 918 de Tours (Ph. Velge et S. Roche) dans le cadre d'un projet collaboratif.

Les souches adressées par des collections de microorganismes sont des souches demandant une expertise du CNRL dans le cadre d'une contestation de leur caractérisation (ex : sérotype) par un client de ces collections.

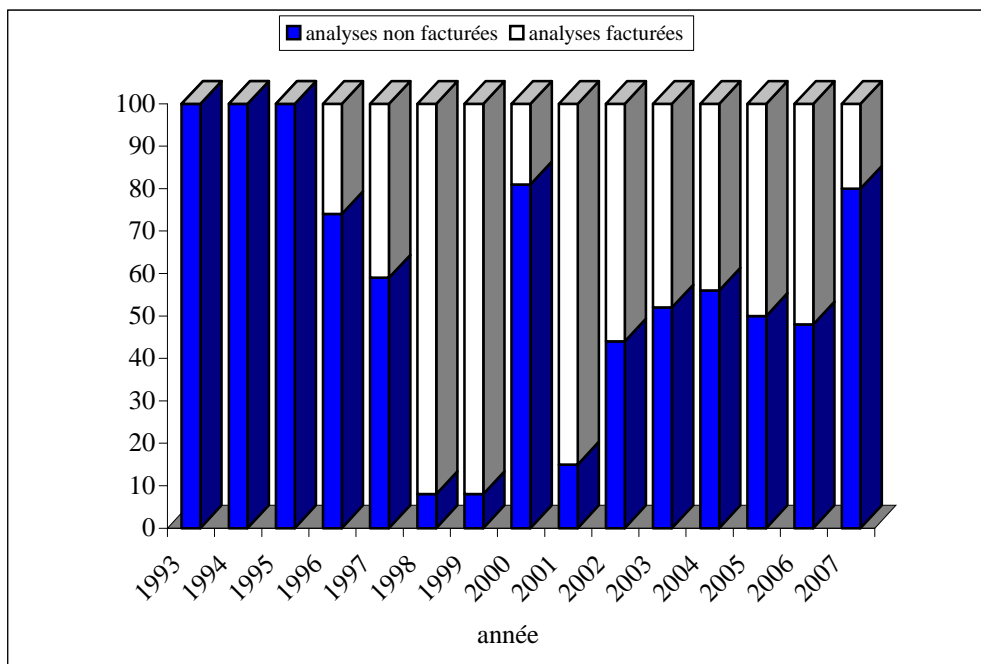
Les souches vétérinaires ont été adressées par les LVD suite à l'information par le CNRL de cette possibilité d'envoi pour identification et typage. Une souche vétérinaire en 2007 a été incluse dans un signalement (L07/14 : souche isolée d'un avortement dans un troupeau bovin de production laitière) ce qui démontre l'importance de collecter ces souches afin d'identifier le début de la contamination de la chaîne alimentaire et assurer sa maîtrise par l'action de la Cellule *Listeria*.

→ En 2007, le CNRL a reçu une demande d'un laboratoire Neo-Zelandais du Ministère de l'Agriculture souhaitant effectuer des PCR pour la détection de *L. monocytogenes* dans des tissus animaux de cas de listérioses bovines.

Les demandes de prestations ou « demande client » sont facturées aux laboratoires expéditeurs, contrairement aux analyses effectuées sur les souches reçues dans le cadre de la surveillance et des investigations autour de cas humains de listériose (signalements, enquêtes formes neuro-méningées, alertes DGAI). Ces analyses sont prises en charge par le CNRL dans le cadre d'un accord entre le CNR, la DGAI, l'InVS et la DGCCRF.

→ En 2007, 20 % des essais ont fait l'objet d'une facturation (contre 52 % en 2006) (Figure 23). Étant donnée la fragilité du système d'envoi des souches alimentaires ou environnementales vers le CNRL, le CNRL a décidé de ne plus facturer les caractérisations de souches qui rentraient directement dans le système de surveillance français de la listériose. Les souches traitées de façon confidentielle à la demande du client, les envois en nombre conséquent ou les demandes à caractère exceptionnel sont alors facturées au cas par cas.

Figure 23 : Pourcentage d'essais facturés depuis 1993.



3.2.2 SOUCHES ISOLEES D'ALIMENTS

3.2.2.1 CATEGORIES DE LABORATOIRES AYANT ADRESSE LES SOUCHES

La provenance des 787 souches isolées d'aliments, selon la catégorie de laboratoire, était la suivante :

- Laboratoires Vétérinaires Départementaux (LVD): 469 souches (60 %),
- Laboratoires privés d'hygiène des aliments : 245 souches (31 %),
- Laboratoires Interrégionaux de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes 72 souches (9 %),
- Laboratoire hospitalier : 1 souche (<1%).

→ En 2007, le nombre de souches a baissé de 14% par rapport au nombre de 2006 (911 souches). Ceci peut s'expliquer par :

- la mise en place du LNR *Listeria monocytogenes* qui est un nouveau destinataire des souches d'origine alimentaire. En cas d'erreur d'expédition (9 erreurs en 2007) pour les souches alimentaires isolées dans le cadre d'alertes, le CNR actuellement est contraint de récupérer à ses frais les souches auprès du LNR;
- la facturation par le CNRL des souches d'origine alimentaire non envoyées dans le cadre d'alertes sanitaires

- l'intégration systématique des souches d'origine alimentaire de ses clients dans la surveillance nationale;
- la méconnaissance des laboratoires de la DGCCRF que la caractérisation des souches d'origine alimentaire isolées dans le cadre des plans de surveillance DGCCRF et issues d'inspection n'étaient pas facturées. Cette non-compréhension a provoqué un envoi groupé mais décalé des souches en fin d'année 2007, alors que pourtant certaines souches étaient reliées à des signalements ;
- le coût et les difficultés croissantes de transport des souches puisque pour le domaine agro-alimentaire, il n'existe pas de système de ramassage de souches par des laboratoires de biologie spécialisée ou autres prestataires de service, comme dans le domaine clinique.

➔ En 2007, le CNRL a décidé d'effectuer un retour d'informations sur la listériose à ses correspondants laboratoires d'analyses alimentaires afin de les sensibiliser à l'intérêt d'envoyer les souches dans le cadre de la surveillance nationale de la listériose. Une section spécifique du site Internet sera dédiée à l'alimentaire au premier semestre 2008. Une lettre ou e-mail sera envoyée aux réseaux des Laboratoires Départementaux d'analyses alimentaires et aux services communs des laboratoires de la DGCCRF ainsi qu'aux laboratoires privés.

➔ En 2007, le CNRL a reçu de nombreux appels et e-mails d'hygiénistes hospitaliers ou de Directeur d'hôpitaux concernant le risque alimentaire à *Listeria monocytogenes*. La principale question était centrée sur la procédure à suivre face à un produit alimentaire non conforme pour *Listeria monocytogenes* dans leur hôpital. En conséquence, le CNRL mettra sur son site Internet en 2008 la démarche à suivre dans ce type de cas en accord avec les recommandations de la DGS et rappellera la liste des textes officiels réglementaires à ce sujet.

3.2.2.2 NOMBRE DE SOUCHES ET DISTRIBUTION PAR ESPECE

781 des 787 souches ont été identifiées. Les analyses sur 7 souches n'ont pas pu être effectuées pour les raisons suivantes : tubes de transport cassés (2), souche non viable (1) et souche non *Listeria* (4).

La répartition par espèce des 781 souches de *Listeria* était la suivante :

- *L. monocytogenes* : 767 souches (98 %),
- *L. innocua* : 11 souches (1 %),
- *L. welshimeri* : 2 souches (<1 %).

➔ En 2007, la répartition par espèce démontre que l'application du règlement européen EC 2073/2005 avec le critère microbiologique de sécurité *L. monocytogenes* et les méthodes associées d'analyses aboutissent à une transmission de souches correctement identifiées à l'espèce dans la plupart des cas à l'exception de quelques erreurs (<2 % des souches).

Dans le domaine alimentaire, ceci peut s'expliquer par l'utilisation croissante et normative de géloses chromogéniques ciblant les caractères xylose, rhamnose, β -glucosidase et PIPLC pour identifier à l'espèce monocytogenes les *Listeria*.

3.2.2.3 DISTRIBUTION DES SOUCHES DE *L. MONOCYTOGENES* PAR CATEGORIE D'ALIMENT

L'origine des 767 souches de *L. monocytogenes* selon la catégorie d'aliment, était la suivante :

- viande et produits carnés : 283 souches (37 %),
- lait et produits laitiers : 216 souches (28 %),
- produits de la pêche : 109 souches (14 %),
- autres aliments : 136 souches (18 %),
- origine non précisée : 23 souches (3 %).

Les autres aliments sont de type plats cuisinés, pâtisserie ou chocolats. Les origines non précisées sont des demandes de laboratoires privés dont les analyses ont été facturées et qui n'ont pas souhaité transmettre l'information, ou des souches provenant de l'INRA.

→ En 2007, la distribution des souches de *L. monocytogenes* par catégorie d'aliments reflète les résultats de la synthèse des enquêtes alimentaires autour des cas de listérioses effectuées par l'InVS.

3.2.2.4 DISTRIBUTION DES SOUCHES DE *L. MONOCYTOGENES* PAR GROUPE PCR

La répartition des souches par groupe PCR et par catégorie d'aliment est donnée dans le tableau 13. Les groupes PCR IIa (sérovarys 1/2a, 3a), IIb (sérovarys 1/2b, 3b, et 7), et IIc (sérovarys 1/2c, 3c) représentent 83 % des souches isolées, et sont majoritaires dans chaque catégorie d'aliment. Le groupe PCR IVb (sérovarys 4b, 4d et 4e), pourtant fréquemment à l'origine des cas de listériose humaine, correspond quant à lui à seulement 16 % des souches isolées des aliments.

Tableau 13 : Distribution par groupe PCR et par catégorie d'aliments des 687 souches de *L. monocytogenes* reçues en 2007 de laboratoires français.

Groupe PCR	viande et produits carnés	laits et produits laitiers	produits de la pêche	autres aliments	origine non précisée	Total
IIa	146	91	92	125	13	467 (61 %)
IIb	18	34	3	1	1	57 (7 %)
IIc	79	32	4	0	3	118 (15 %)
IVb	39	59	10	10	6	124 (16 %)
L*	1	0	0	0	0	1 (<1 %)
Total	283 (37 %)	216 (28 %)	109 (14 %)	136 (18 %)	23(3 %)	767

* correspond aux sérovars 4a, 4ab, 4c.

3.2.3 SOUCHES ISOLEES DE L'ENVIRONNEMENT

En 2007, 100 souches provenant de l'environnement ont été reçues au CNR, adressées par les Laboratoires Vétérinaires Départementaux [34 (33 %)], des laboratoires privés [66 (66 %)] et laboratoires hospitaliers [1 (1%)]. Il s'agit d'une baisse de 38% de souches provenant de l'environnement par rapport à l'année 2006.

Il s'agissait dans 91 cas (91 %) de souches de *L. monocytogenes*, dans 8 cas (8 %) de souches de *L. innocua* et dans un cas (1 %) d'une souche non *Listeria*.

La répartition par groupe PCR des 91 souches de *L. monocytogenes* est la suivante :

- groupe PCR IIa (sérovars 1/2a et 3a) : 47 souches (52 %),
- groupe PCR IIb (sérovars 1/2b, 3b et 7) : 16 souches (18 %),
- groupe PCR IIc (sérovars 1/2c et 3c) : 13 souches (14 %),
- groupe PCR IVb (sérovars 4b, 4d et 4e) : 13 souches (14 %),
- groupe PCR L (sérovars 4a, 4ab et 4c) : 2 souches (2 %)

Comme pour les souches isolées d'aliments, les souches des groupes PCR IIa, IIb et IIc sont majoritaires, soit 84 % des souches de *L. monocytogenes* isolées de l'environnement.

➔ En 2007, la majorité des souches de l'environnement sont en réalité des souches de l'environnement agro-alimentaire ou de surface de réfrigérateurs lors d'enquêtes alimentaires. Ce fait est problématique pour les chercheurs désireux d'obtenir des souches véritablement isolées de l'environnement (sol, eau, boue, etc.) afin d'effectuer des études phylogénétique, de virulence, d'acquisition/sélection de gènes, etc.

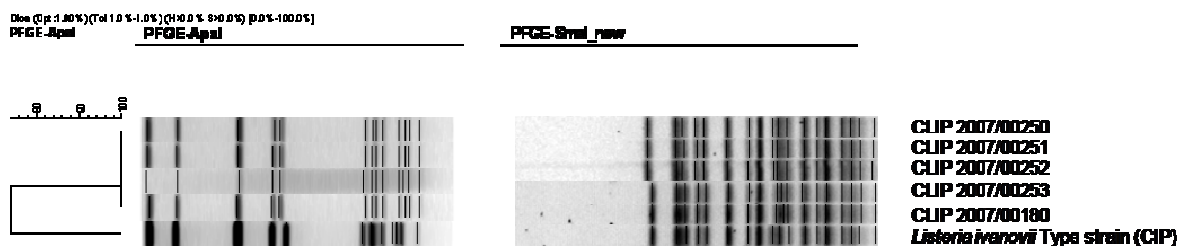
3.3 BILAN DES INVESTIGATIONS, SIGNALEMENTS ET ALERTES

3.3.1 INVESTIGATIONS

3.3.1.1 ISOLEMENT ET INFECTION A *L. IVANOVII* SUBSP. *IVANOVII*

• Au premier trimestre 2007, un cas d'infection à *L. ivanovii subsp. ivanovii* a été diagnostiqué chez un patient âgé de 55 ans présentant une gastroentérite et une septicémie dans un centre hospitalier universitaire d'Ile de France (Figure 24). Ce patient avait comme terrain sous-jacent une transplantation d'organe. Trois souches d'hémocultures et une souche de coproculture ont montré les mêmes profils de macrorestriction d'ADN *AscI*, *ApaI* et *SmaI*. A la demande de la Cellule *Listeria*, ces souches humaines ont été comparées à des souches alimentaires et environnementales d'alertes DGAI (2006/483) et DGCCRF sans trouver de similarité.

Figure 24 : Profils par macrorestriction d'ADN avec les enzymes *ApaI* et *SmaI* des souches de *L. ivanovii subsp. ivanovii* du premier trimestre 2007.



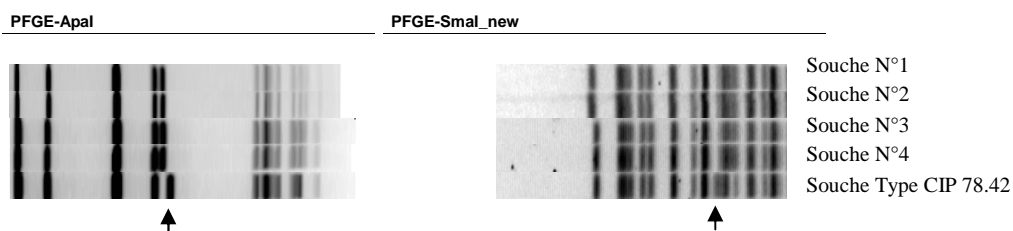
• Au quatrième trimestre 2007, quatre isollements chez l'homme de *L. ivanovii subsp. ivanovii* ont été enregistrés dans un même centre hospitalier français :

- La première souche a été isolée d'un prélèvement peropératoire (appendicectomie) d'un enfant de 9 ans qui est passé le jour même en salle de réveil (attente au service de réanimation),
- La seconde souche a été isolée lors de la mise en culture systématique d'un cathéter sous clavier gauche retiré d'un patient de 38 ans hospitalisé dans le service de réanimation pour suspicion de pneumopathie gauche et alcoolisation,
- La troisième souche a été isolée lors de la mise en culture à titre systématique d'un cathéter artériel fémoral droit retiré d'un patient de 64 ans hospitalisé dans le service de réanimation pour méningoencéphalite lymphocytaire sans étiologie mise en évidence,
- La quatrième souche a été isolée lors de la mise en culture d'un cathéter sous clavier gauche au retrait systématique du cathéter en Service de Cardiologie d'un patient de 82 ans admis aux urgences pour choc cardiogénique sans point d'appel infectieux sur infarctus antérieur étendu.

Les investigations autour de ces cas ont été coordonnées par l'Unité des infections nosocomiales et résistance aux antibiotiques de l'InVS et ont impliqué les différents services concernés, le laboratoire et le service d'Hygiène hospitalière de l'hôpital mais aussi la DDASS et le CNR des *Listeria*. Toutes les souches présentent les mêmes caractéristiques microbiologiques (Figure 25). Cependant, aucune des hypothèses envisagées ne permet d'expliquer ces 4 cas et aucune origine commune de contamination n'a pu être mise en évidence. Toutefois, il est possible que la souche isolée du cathéter du quatrième patient soit liée à une contamination de laboratoire à partir des prélèvements positifs du troisième patient. Cette possibilité ne permet pas d'expliquer les autres cas et l'hypothèse d'une contamination nosocomiale à germe opportuniste semble la plus probable bien qu'à confirmer. Au final, il a été retenu l'absence d'infection liée au cathéter des patients 2 et 3, pour lesquels il a été conclu à une colonisation sans infection (aucune hémoculture n'a été positive à *Listeria* ni aucun point de ponction de cathéter). Une étude plus approfondie de ces va être entreprise en collaboration avec l'unité « Infections nosocomiales et résistance aux antibiotiques ».

↳ Lors de cette investigation, le CNR des *Listeria* a optimisé la méthode de typage par macrorestriction d'ADN des *L. ivanovii subsp. ivanovii* qui était basée sur deux publications de méthodes validées sur un nombre restreint de souches. Ceci a été possible en collaboration avec Ph Glaser (Unité de Génétique des Génomes Bactériens, Institut Pasteur) qui nous a donné accès aux données, non publiées, du séquençage du génome de *L. ivanovii subsp. ivanovii*.

Figure 25 : Comparaison des profils de macrorestriction avec *ApaI* et *SmaI* des souches du deuxième épisode de contamination humaine à *L. ivanovii subsp. ivanovii*.



→ Comparativement à *L. monocytogenes*, *L. ivanovii subsp. ivanovii* est une espèce encore plus clonale. Néanmoins, il existe une certaine diversité et il est possible de différencier des groupes. Cette différenciation peut être faite sur la base des gènes inactivés (pseudogènes) et l'analyse de leurs séquences. Les souches humaines de 2007 sont en cours d'analyse par cette méthode pour savoir s'il s'agit d'un clone particulier ou de souches différentes entre les deux épisodes français ; leurs profils par macrorestriction d'ADN sont similaires.

⊗ En 2008, le CNR affinera sa méthode de typage pour *L. ivanovii subsp. ivanovii* et surveillera les souches humaines et non-humaines qui lui seront transmises. Ces cas interpellent sur

l'émergence potentielle d'une espèce jusqu'ici considérée comme non pathogène pour l'homme, bien que dans la plupart des cas le caractère opportuniste prévale. Cependant, ces cas soulignent aussi l'intérêt d'un domaine d'expertise non restreint à la seule espèce *L. monocytogenes*.

3.3.1.2 SUSPICIONS D'INFECTIONS NOSOCOMIALES A *L. MONOCYTOGENES*

➤ Pour un patient en fin de vie présentant une forme bactériémie/septicémie, une enquête alimentaire a été mise en œuvre (cf. signalement L06/10). Ce patient étant hospitalisé depuis plus de 2 mois. Les prélèvements non humains ont consisté en des prélèvements de l'environnement des cuisines de l'hôpital. Quatre souches isolées du plan de travail et du trancheur de ces cuisines présentaient les mêmes caractéristiques que la souche du patient. Cependant, aucun des aliments potentiellement contaminés n'a été consommé par ce patient en fin de vie uniquement sous alimentation parentérale. Si le mode de contamination nosocomial est fortement suspecté, il n'a pu être formellement affirmé malgré ces investigations.

➤ A trois reprises, le diagnostic de plusieurs cas de listériose groupés temporellement et géographiquement (même hôpital, voire même service) ont fait suspecter un mode d'infection nosocomiale :

➔ Dans le premier cas, une infection nosocomiale a été suspectée au niveau de la maternité d'une clinique privée. Le premier cas correspond à une forme materno-néonatale fatale diagnostiquée par l'isolement de *L. monocytogenes* dans les hémocultures. Le second cas correspond à une forme néonatale diagnostiquée pour un nouveau-né quelques jours après sa naissance. Les mères des deux enfants étaient hospitalisées le même jour, dans des chambres en vis-à-vis. Une transmission nosocomiale a été suspectée sur la base des renseignements fournis et de la séquence caractéristique. Les deux souches de *L. monocytogenes* de groupe PCR IVB présentaient les mêmes profils de macrorestrictions. L'InVS a sollicité le CNRL pour comparer l'ensemble des souches humaines transmises par ce CHU en 2007 et les deux souches de formes materno-néonatales. Aucune souche avec les mêmes caractéristiques microbiologiques n'a pu être isolée de l'environnement hospitalier, ni des aliments autres que celles des patients. Aucun lien microbiologique n'a été mis en évidence, et les modalités de transmission nosocomiale, quoique très probable, n'ont pas été élucidées.

➔ Dans un deuxième cas, deux souches humaines de forme « bactériémie/septicémie » ont été comparées à la demande de la DDASS dans le cadre de l'investigation d'une contamination d'un des 2 patients dans un hôpital après son transfert d'un autre hôpital où il séjournait au contact d'un patient atteint de listériose. Aucun lien microbiologique entre ces souches n'a pas été observé et aucune souche similaire n'a pu être isolée de l'environnement hospitalier, ni des aliments. La transmission nosocomiale apparaît donc ici comme peu probable.

→ Dans un troisième cas, trois souches de *L. monocytogenes* ont été adressées par un centre hospitalier. L'isolement de *L. monocytogenes* par le laboratoire de bactériologie de ce même hôpital dans du maroilles servi au self-service de l'hôpital a laissé suspecter une infection nosocomiale. Cependant aucun lien microbiologique entre ces souches humaines et alimentaires n'a été observé.

3.3.1.3 INFECTION D'ORIGINE ALIMENTAIRE DANS LES ALPES-MARITIMES

4 personnes en pique-nique ont consommé un saucisson qui contenait moins de 5 UFC/g de *L. monocytogenes*. Ces personnes ont été atteintes de vomissements et de douleurs abdominales. La souche alimentaire a été reliée aux caractéristiques microbiologiques du signalement L07/12. Faute d'avoir eu des informations sur la présence de diarrhées chez le patient à l'origine du signalement, il n'a pu être conseillé d'effectuer des coprocultures sur milieu sélectif chromogène. Ainsi, il n'a pas été possible d'affirmer le lien microbiologique entre les patients et le saucisson incriminé.

3.3.1.4 ENQUETE ALIMENTAIRE DANS UNE CUISINE CENTRALE

Des plats fortement contaminés en *L. monocytogenes* (68.000 à 300.000 CFU/g) préparés dans une cuisine centrale ont été détectés lors d'autocontrôles. Aucun cas humain n'a été associé à leur consommation. Cette cuisine distribue des repas sur site à des écoles, des centres aérés et quelques personnes âgées. La population à risque pour la listériose n'était donc pas majoritairement en contact avec ces aliments mais des contaminations secondaires étaient envisageables. Une réunion téléphonique de la cellule *Listeria* en juin 2007 pour coordonner la gestion de cette situation a été effectuée.

La DDSV a soupçonné une contamination des locaux et les prélèvements d'environnement ont abouti à la mise en évidence de la contamination d'un siphon d'évier. Le CNR a donné son appui technique pour des conseils sur les prélèvements de l'environnement. La DDSV ayant demandé la fermeture de la cuisine pour nettoyage et désinfection, une réouverture a été effectuée avec consigne de servir des plats cuits et des produits prêts à consommer sans transformation.

La DDASS a été informée qu'une enfant d'une école a été prise en charge pour une gastroentérite qui pourrait être liée à la consommation de ces aliments contaminés. Le CNR a contacté le médecin traitant de cet enfant afin de programmer une coproculture avec recherche de *Listeria* à l'hôpital le plus proche. Le CNR a assisté le Biologiste de l'hôpital sur les méthodes de coproculture adaptées à la mise en évidence de *L. monocytogenes* dans les selles. La coproculture fut négative. Le CNR a continué à suivre durant l'année 2007 les cas dans ce département potentiellement en lien avec cette alerte : seulement un cas non relié à cet épisode de listériose a été enregistré en 2007 dans ce département mais il n'était pas relié épidémiologiquement à cet épisode. Concernant l'opportunité d'un traitement préventif chez les personnes fortement contaminées de cet épisode mais asymptomatiques, le CNR a rappelé la

position de la Haute Autorité de Santé qui ne préconise pas une telle démarche même chez les populations à risque y compris chez les femmes enceintes.

3.3.2 SIGNALEMENTS

En 2007, la procédure de signalement a suivi les différents textes de fonctionnement de la Cellule *Listeria* fixant les critères de signalement par le CNRL (cf. chapitre 3.3.2.). Ces textes avaient été mis à jour tout comme la nomenclature des signalements avait également été modifiée depuis le 3 Août 2006. L'ancienne nomenclature attribuait au signalement la date à laquelle il avait été effectué. La nouvelle nomenclature utilise la lettre L (pour *Listeria*), l'année (ex : 07 pour 2007) et le numéro d'ordre dans l'année (Lxx/xx). Pour plus de clarté, la description des signalements effectués en 2007 fera référence aux 2 nomenclatures (Tableau 14).

En 2007, le CNR a effectué 16 signalements (contre 11 en 2006) pour des souches de sérotype PCR IVb (13), IIa (2) et IIb (1), dont un est toujours actif (L07/12). Il s'agit du nombre le plus élevé de signalements depuis l'année 2000 sachant par ailleurs que depuis Août 2006 les critères de signalement avaient été optimisés pour plus diminuer les investigations inutiles dans certains cas (Cf. Chapitre 5.1.1.). Par rapport à 2006, un signalement impliquait des souches de sérotype IIb. Trois signalements effectués en 2006 ont concerné des cas diagnostiqués en 2007 et ont été clos en 2007. Trois signalements effectués en 2007 ont été clos en 2008 (et un encore actif, le L07/12).

Cent six cas, soit 35% des 306 cas diagnostiqués en France en 2007 ont été reliés à un signalement. Ceci est équivalent aux nombres de cas en 2006 (35% de tous les cas déclarés) mais là encore supérieur aux 61 (29%) cas rapportés en 2005. Onze décès ont été répertoriés par le CNR sur ces 106 cas mais cette information est partielle (centralisée par l'InVS). La distribution des signalements selon la forme clinique est différente par une baisse pour les cas de bactériémies/septicémies contrebalancées par une hausse des infections du système nerveux central entre 2006 et 2007.

Tableau 14 : Synthèse des signalements effectués par le CNR en 2007 et rappel des ignalements ouverts en 2006 et clôturés en 2007.

Signalement	ex numérotation	Date du signalement	Date de cloture	Caractéristiques des souches		
				Groupe PCR	Profil <i>AscI</i>	Profil <i>ApaI</i>
L06/04	02/06/2006	02/06/2006	05/03/2007	IVb	151005	151005
L06/10	12/12/2006	12/12/2006	10/07/2007	IIa	010901	020701
L06/11	26/12/2006	26/12/2006	22/01/2007	IVb	011001	160602
L07/01 (=L06/12)	08/01/2007	08/01/2007	12/02/2007	IVb	200792	200792
L07/02	22/02/2007	22/02/2007	17/04/2007	IVb	270801	050506
L07/03	05/03/2007	05/03/2007	11/06/2007	IVb	200792	200792
L07/04	27/03/2007	27/03/2007	09/05/2007	IVb	151005	151005
L07/05	10/04/2007	10/04/2007	14/05/2007	IVb	210792	210792
L07/06	04/06/2007	04/06/2007	14/05/2007	IVb	200792	170407
L07/07 (=L07/05)	04/06/2007	04/06/2007	22/10/2007	IVb	210792	210792
L07/08 (=L06/10)	30/07/2007	30/07/2007	03/09/2007	IIa	010901	020701
L07/09	22/08/2007	22/08/2007	10/09/2007	IIb	090507	180407
L07/10 (=L07/03)	27/08/2007	27/08/2007	22/10/2007	IVb	200792	200792
L07/11 (=L07/02)	03/09/2007	03/09/2007	01/10/2007	IVb	270801	050506
L07/12 (=L07/08)	26/09/2007	26/09/2007	En cours	IIa	010901	020701
L07/13 (=L06/11 et L07/03)	19/11/2007	19/11/2007	10/12/2007	IVb	011001	160602
L07/14 (=L07/10)	19/11/2007	19/11/2007	07/01/2008	IVb	200792	200792
L07/15 (=L06/06, L07/14)	26/11/2007	26/11/2007	07/01/2008	IVb	220803	200792
L07/16 (=L07/11)	26/11/2007	26/11/2007	21/12/2007	IVb	270801	050506

3.3.3 ALERTES DGAL

Il s'agit d'identifier les cas dus à des souches présentant les mêmes caractéristiques que celles isolées de produits alimentaires contaminés par *L. monocytogenes*, commercialisés ou non, et qui ont fait l'objet d'un enregistrement par la DGAL, sous la forme d'une simple non-conformité *Listeria*, d'une notification d'une Direction Départementale des Services Vétérinaires ou d'une notification via le réseau européen des alertes.

➔ En 2007, 513 souches ont été adressées au CNR dans le cadre des 198 alertes réalisées par la DGAL (contre 200 alertes en 2006). Une alerte en décembre 2007 sur un produit de bœuf cuit contaminé à un seuil de 700.000 ufc/g a donné lieu à l'émission d'un protocole d'information, de coordination, de gestion des alertes sanitaires d'origine alimentaire entre les administrations centrales avec mise en application de mesures telles que le retrait des lots et la pose d'affichettes en magasin.

Ces souches se décomposent en 29 souches d'échantillons de l'environnement et 485 échantillons d'aliments. 180 souches caractérisées en 2007 au CNR proviennent d'alerte de 2006 et 6 souches caractérisées en 2008 correspondent à 4 alertes de 2007.

Par rapport à l'ensemble des souches non humaines reçues au CNRL, les souches d'alertes représentent 54% en 2007. Ceci démontre que la surveillance nationale ne se base pas uniquement sur les souches d'alertes.

La répartition par espèce des 513 souches de *Listeria* issues d'aliments analysés spécifiquement pour *L. monocytogenes* dans le cadre des alertes était la suivante:

- 501 (97%) souches étaient des *L. monocytogenes* ;
- 9 (2%) souches étaient des *L. innocua* ;
- 1 (<1%) souche n'était pas une *Listeria* ;
- 2 (<1%) tubes contenant les souches étaient cassés à réception.

Cette fréquence d'identification correcte des *L. monocytogenes* montre les avancées des méthodes normatives ou alternatives dans le domaine alimentaire spécifique de *L. monocytogenes*.

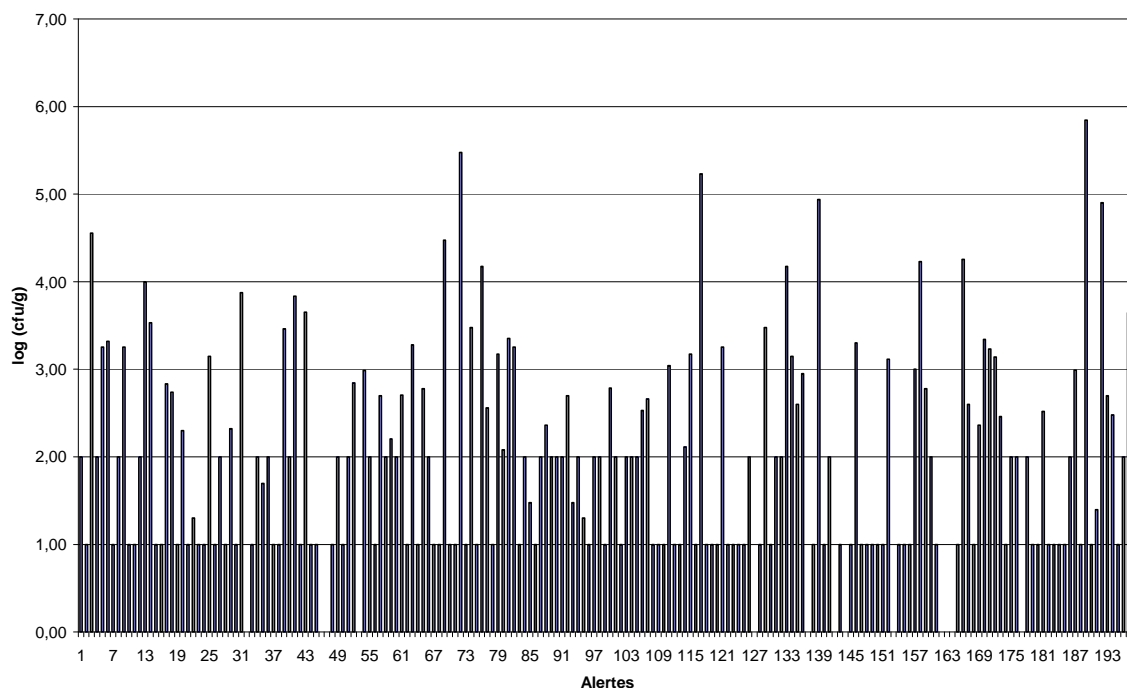
➔ En 2007, le CNRL a assisté plusieurs fois les DDSV dans la réalisation d'échantillons d'environnement selon la norme EN ISO 18593 stipulée dans le règlement EC 2073/2005 et sur les méthodes normalisés ou validés et leurs performances.

La répartition par groupe PCR des 501 souches de *L. monocytogenes* issues d'aliments analysés spécifiquement pour *L. monocytogenes* dans le cadre des alertes était la suivante:

- groupe PCR IIa (sérovarys 1/2a et 3a) : 336 souches (67 %),
- groupe PCR IIb (sérovarys 1/2b, 3b et 7) : 43 souches (8%),
- groupe PCR IIc (sérovarys 1/2c et 3c) : 49 souches (10 %),
- groupe PCR IVb (sérovarys 4b, 4d et 4e) : 73 souches (15 %),
- groupe PCR L (sérovarys 4a, 4ab et 4c) : 0 souches (0 %)

Les dénombrements en *Listeria monocytogenes* variaient de 10 à 700.000 ufc/g. Le jambon cuit tranché sous vide, les rillettes, les tripes, les saucissons de porc, le museau de porc et les andouilles sont parmi les aliments les plus contaminés (numération ≥ 1.000 ufc/g). La distribution des énumérations est présentée dans la figure 26.

Figure 26 : Distribution des énumérations en *L. monocytogenes* en UFC par gramme de produits des alertes DGAI 2007.



En 2007, une ou plusieurs souches (médiane de 6 souches [1-106]) par alerte ont été isolées d'aliments ou de leur environnement et envoyées au CNR. Une alerte 2006/975 a comptabilisé 106 souches caractérisées au CNR en 2007. Ceci correspond à 118 envois de souches au CNR.

➔ Après discussion avec certains laboratoires, le CNRL a rappelé que l'on ne peut extrapoler la caractéristique microbiologique d'une souche provenant d'un produit aux autres mêmes produits prélevés en même temps et s'étant révélés positifs à *L. monocytogenes*. Une souche au minimum par produit positif est à envoyer au CNRL et, comme le prescrivent les normes, 5 souches idéalement par produit positif.

➔ En 2007, 130 souches d'alertes DGAI présentaient les mêmes groupes PCR et profils de macrorestriction que des souches de signalements.

3.3.4 ALERTE DGCCRF

Les alertes DGCCRF sont issues des échantillons ne répondant pas aux critères microbiologiques réglementaires pour *L. monocytogenes* lors de l'application du plan de surveillance 2007 pour *Listeria* et lors d'inspection.

L'analyse des résultats montre que la qualité microbiologique des diverses catégories d'aliments surveillés s'améliore concernant la présence de *L. monocytogenes*. Par ailleurs, la grande

majorité des échantillons qui sont contaminés contiennent moins de 100 *L. monocytogenes* par gramme, seuil considéré comme ne présentant pas de danger pour les personnes sans sensibilité spécifique pour la listériose. Le pourcentage d'échantillons contenant plus de 100 *L. monocytogenes* par gramme a tendance à diminuer depuis 1998.

→ En 2007, 72 souches ont été réceptionnées dans le cadre des alertes DGCCRF. Une incompréhension sur la dénomination du terme « alerte » dans les laboratoires de la DGCCRF a entraîné un arrêt des envois vers le CNR. Après explication par le membre de la Cellule *Listeria* représentant la DGCCRF de ce terme à ces laboratoires, des envois en nombre de souches sont arrivés en fin d'année 2007. A ce jour, il n'est pas possible de faire un bilan des alertes DGCCRF de 2007 étant donné que la totalité des souches n'est pas encore arrivée au CNR pour caractérisation (19 souches de 2007 arrivées pour l'instant en 2008).

→ En 2008, le plan de surveillance sera mis en place dans la moitié des régions métropolitaines. Il concernera environ 4000 échantillons répartis en 17 catégories.

3.3.5 ENQUETE DES FORMES NEURO-MENINGEES

Cette enquête associe les différents partenaires de la Cellule *Listeria* chargée des investigations et actions et elle est coordonnée par l'InVS. Ce protocole d'investigation, spécifique des formes neuro-méningées, a commencé en août 2001.

On définit un cas de forme neuro-méningée comme tout cas de listériose avec une date de diagnostic (date d'isolement de la souche) comprise entre 01 janvier 2007 et le 31 décembre 2007 et présentant une forme clinique neuroméningée selon les critères de la DO (signes cliniques d'atteinte neuroméningée et souche de *L. monocytogenes* isolée du sang ou du LCR).

Lors de la notification d'un cas de listériose neuroméningée, ces investigations consistent à réaliser des prélèvements des aliments présents dans le réfrigérateur du patient ou de son environnement (avec l'accord du patient ou le cas échéant de sa famille) par la DDSV. Elles consistent aussi à effectuer des prélèvements de produits par la DDCCRF dans ses lieux habituels d'achat, pour recherche de *Listeria monocytogenes*, notamment guidé par l'analyse du questionnaire interrogatoire alimentaire.

Les membres de la Cellule *Listeria* sont prévenus par e-mail par l'InVS. Pour le CNRL, il s'agit de réaliser un groupage PCR et un typage par macrorestriction d'ADN avec les enzymes *AscI*, *ApaI* et *SmaI* si nécessaire sur les souches alimentaires et celle du patient. Le CNR effectue ensuite une comparaison des pulsotypes des souches isolées des aliments à celle(s) isolée(s) chez

le patient afin d'identifier rapidement l'aliment à l'origine du cas et transmet les informations sur les souches similaires en pulsotype à celle du cas humain à la Cellule *Listeria*.

L'ensemble de ces opérations est relié par un numéro de DO communiqué par l'InVS qui permet de correctement transmettre les informations entre les différents services et les membres de la Cellule *Listeria* afin de préserver l'anonymat du patient.

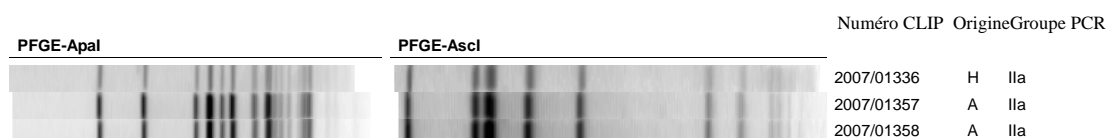
Historiquement, ces enquêtes ont été limitées aux formes neuroméningées à cause de leurs caractéristiques notamment leur durée d'incubation plus courte en général moins de 15 jours.

→ En 2007, sur les 306 cas de listériose déclarés, **ces investigations ont concerné 43 cas répartis sur toute la France, soit 65 % (contre 59% en 2006) des infections du système nerveux central identifiées par le CNR en 2007.** 14 (33%) investigations ont été suivies d'échantillons prélevés dans le réfrigérateur du patient par la DSV et la DGCCRF avec son accord. Les causes possibles des cas non investigués sont liées à des patients décédés ou en fin de vie ce qui crée un contexte psychologique difficile pour effectuer un interrogatoire, ou encore à des réfrigérateurs vidés et nettoyés suite aux événements. Pour une forme neuroméningée, la souche n'a pas été récupérée malgré les efforts des différents partenaires de la Cellule *Listeria* et du CNR.

18 cas étaient rattachés à un signalement [L06/04 (1), L07/02 (1), L07/03 (5), L07/04 (1), L07/05 (2), L07/06 (2), L07/07 (3), L07/09 (1), L07/11 (1), L07/12 (1)] et deux cas à une alerte alimentaire DDSV chez un boucher du Calvados.

Pour 12 investigations (87 %) effectuées dans le réfrigérateur du patient, des aliments ou des prélèvements de l'environnement ont été trouvés positifs à *Listeria monocytogenes*. Les résultats de la caractérisation des 27 souches reçues ont montré que dans 8 cas (57%), les souches d'origine alimentaire étaient non différenciables de celles isolées chez le patient. Dans la figure 27, un exemple d'investigation d'un cas de forme neuroméningée a permis d'isoler une souche provenant du réfrigérateur et de l'associer au cas.

Figure 27 : Exemple de résultat de typage de PFGE dans une investigation d'un cas de formes neuroméningées. La souche alimentaire est similaire à la souche du patient de la DO 2491.



Un bilan sur 17 mois (août 2001-décembre 2002) de fonctionnement a été publié en 2004 (Richard et coll., 2004). Les données pour 2005, 2006 et 2007 sont très inférieures à celles de 2003: respectivement 69 %, 59 % et 65% de cas neuroméningés inclus dans l'enquête en 2005, 2006 et 2007 contre 88 % en 2003 et respectivement 17 %, 16% et 33% de cas avec prélèvements positifs en 2005, 2006 et 2007 contre 41 % en 2003. Les données pour 2007 sont cependant

supérieures à celles de 2006.

Ainsi, les prélèvements à domicile proposés systématiquement à tous les cas de listériose neuroméningée paraissent un complément utile à la surveillance de la listériose réalisée par la DO et le CNR et permettent dans certains cas d'identifier rapidement la source de contamination

3.3.6 CONCLUSION

Comme pour la plupart des pays industrialisés, le système de surveillance microbiologique de la listériose, basé sur l'étude des souches par le CNRL, est un système basé sur le volontariat des biologistes médicaux qui acceptent d'adresser leurs souches au CNRL. La collecte des données n'est donc pas exhaustive et est parfois retardée. Il répond cependant parfaitement à la nécessité d'identifier précisément les augmentations du nombre de cas et de distinguer les cas groupés dus à une souche unique des augmentations de cas à souches multiples. Il permet également de visualiser un certain nombre de tendances en matière de cas sporadiques (évolution des formes cliniques, caractéristiques des souches responsables de ces infections, etc.).

La surveillance régulière de la listériose humaine en 2007 a confirmé l'augmentation du nombre de cas déjà observés en 2006.

Il apparaît donc nécessaire de renforcer les efforts déjà entrepris notamment en matière d'hygiène et de contrôle par l'industrie agro-alimentaire ainsi que la sensibilisation des groupes de personne à risque et des professionnels de santé.

Les patients pour lesquels l'information était connue avaient le plus souvent un terrain prédisposant au développement de la listériose. Il serait indispensable de faire évoluer les rubriques de la déclaration obligatoire dans le but d'accroître le nombre de données clinicobiologiques autour des cas (traitements, évolution, pronostic, etc.). Un recueil partagé entre l'InVS et le CNRL et enrichi de ce type d'informations sera ainsi de nature à faciliter l'analyse des facteurs de risque à l'origine de l'incidence croissante des cas à l'échelon national et communautaire.

Le support de ce recueil devra également évoluer vers la déclaration en ligne, plébiscitée par les microbiologistes car plus rapide et plus motivante. Ce système déjà développé par d'autres CNR, apporte au final plus de réactivité au système. Il nous semble également nécessaire, afin de préciser les caractéristiques médicales des patients et de mieux connaître la pathologie induite par *L. monocytogenes*, de lancer, en partenariat avec l'InVS, une étude prospective clinique et microbiologique, valorisant ainsi le système de surveillance et de déclaration des cas. Celle-ci devrait notamment permettre de mieux comprendre la raison de l'augmentation du nombre de cas observés ces deux dernières années.

4 ACTIVITES D'INFORMATION, DE FORMATION ET DE CONSEIL

4.1 CENTRE DE DOCUMENTATION

Le Centre National de Référence des *Listeria* possède une bibliothèque contenant la majorité des articles sur *Listeria* depuis 1950 en version papier ou depuis 1995 en version électronique. La bibliographie sur *Listeria* est actualisée mensuellement à partir des bases de données Current contents (Agriculture), Sciencedirect (Général) database et hebdomadairement à partir de Medline (Medical/Scientifique). Des tirés-à-parts des articles sont obtenus des auteurs ou à partir de la librairie online de l'Institut Pasteur. Les rapports ou bulletins, version papier ou électronique d'organisation ou d'agence nationale, européenne ou internationale sont reçus régulièrement et sont stockés sur le serveur du CNRL/CCOMS.

Sur demande motivée, le CNRL/CCOMS peut donc envoyer des copies d'articles sur *Listeria* en respectant les droits de Copyright et peut procurer une liste de référence sur un sujet associé sur *Listeria* et/ou la listériose.

→ En 2007, par exemple, des synthèses de documents sur la contamination des harengs fumés, la contamination des champignons ainsi que l'impact du procédé du blanchiment et la contamination du beurre ont été sollicités par l'InVS ainsi qu'une synthèse sur les barèmes de température dans les viandes pour un industriel agro-alimentaire. Des sociologues de l'INRA ont souhaité consulter sur place la bibliothèque du CNRL/CCOMS. De nombreux étudiants ont demandé des copies d'article sur les épidémies ou des revues sur la listériose. On peut ici rajouter la participation au Réseau de Microbiologistes Médicaux (R2M) des cadres du CNRL afin de répondre le cas échéant à toutes questions spécifiques de Listériose ou demande de bibliographie sur ce sujet.

4.2 DIFFUSION DE L'INFORMATION SUR *LISTERIA* ET LA LISTERIOSE

Le CNRL a également pour mission la mise à jour des connaissances dans le domaine de *Listeria* et de la listériose. Il assure leur diffusion auprès du grand public dont notamment des personnes à risque, ainsi qu'auprès des professionnels de santé et du secteur agro-alimentaire afin de les sensibiliser sur le risque *Listeria*. Pour cela plusieurs supports de diffusion de l'information ont été développés par le CNRL [conférences et cours ; participation à des congrès (communication) ; rédaction de revues générales; communiqués de presse ; site Internet ; adresse e-mail et numéro de téléphone dédiés; formation et encadrement de stagiaires, etc.].

4.2.1 SITE INTERNET

→ En 2007, le CNRL/CCOMS des *Listeria* dispose d'un site internet bilingue (français/ anglais : <http://www.pasteur.fr/sante/clre/cadrecnr/Listeria-index.html>) qui est régulièrement consulté. Ce site permet de télécharger de nombreux documents utiles, notamment les différentes feuilles de recueil d'informations devant accompagner l'envoi de souches, des liens utiles et une rubrique de réponses aux questions fréquemment posées au CNRL (FAQ).

→ En 2007, le CNRL a commencé à répertorier l'ensemble des sites Internet en langue française afin de solliciter les modifications des données erronées ou ajouter un complément d'informations ou effectuer un lien avec le site Internet du CNRL.

→ En 2007, le CNRL a participé à la relecture et aux corrections d'une fiche synthétique sur « *Listeria* et la listériose » pour le site de la DGS.

4.2.2 COURS ET CONFERENCES SUR INVITATION

En 2007, les collaborateurs du CNRL ont donné 5 cours :

- Cours de Bactériologie Médicale, Institut Pasteur, Paris, Cours sur *Listeria* et Listériose, le 16 Mars 2007, A. Le Monnier
- Cours de Bactério Médicale, Institut Pasteur, Paris, Travaux Pratiques sur la PFGE, 16 Mars 2007, A. Le Monnier - A. Morvan.
- Cours sur *Listeria* et *Yersinia*, Institut Pasteur de Lille, Lille, Cours de Microbiologie pour les techniciens, 20 Mars 2007, A. Leclercq
- Cours sur les toxi-infections d'origine alimentaire et les *Listeria*, Institut Pasteur de Lille, Lille, Cours International de Microbiologie et d'Hygiène des Aliments, 01 Juin 2007, A. Leclercq
- Cours sur les *Listeria*, Institut Pasteur de Lille, Lille, Cours Le point sur les principaux microorganismes pathogènes, 19 Juin 2007, A. Leclercq

4.2.3 FORMATION ET ENCADREMENT

Le CNR est régulièrement sollicité du fait de son expertise dans le domaine des *Listeria* pour des demandes d'accueil de stagiaire pour formation.

→ En 2007, nous avons accueilli 2 stagiaires de différentes formations et origine.

→ En 2007, les responsables du CNR *Listeria* ont encadré et ont été membres du jury de 2 thèses de doctorat d'université, d'une thèse de doctorat d'état (DES) et d'un mémoire de fin d'étude.

4.2.4 DEMANDE D'INFORMATIONS ET DE CONSEILS

Devant un nombre croissant de sollicitations par courrier électronique et par téléphone, nous avons recensé et détaillé les demandes par e-mail (listeria@pasteur.fr) et les appels téléphoniques pour l'année 2007.

Nous avons reçu plus de 295 messages par courrier électronique sur l'ensemble de l'année 2006 (~5/semaine) et 340 appels téléphoniques (~6/semaine). Ci-dessous figure la répartition des principales motivations de ces demandes selon les catégories de personnes concernées :

1/ Professionnels de santé

- demandes de renseignements concernant l'envoi de souche (feuilles de demande à renseigner, adresse pour l'envoi, condition de transport, facturation et/ou prise en charge financière de l'envoi, etc.) ;
- demandes de conseils microbiologiques (prélèvements biologiques à réaliser, isolement, identification, typage des souches, et/ou interprétation des résultats) ;
- demandes d'aide au diagnostic (réalisation d'antibiogramme, diagnostic complémentaire par PCR et/ou sérologie) ;
- demandes de conseils thérapeutiques (alternative thérapeutique en cas d'allergie aux β -lactamines, antiobio prophylaxie en cas d'exposition au risque *Listeria* (cliniciens, médecins du travail, hygiénistes, etc.)).

2/ Professionnels de l'alimentaire

- demandes de renseignements concernant l'envoi de souche (feuilles de demande à renseigner et condition de transport, adresse, et/ou tarif et facturation, etc.) ;
- demandes de conseils microbiologiques (prélèvements à réaliser, isolement, identification, typage des souches, et/ou interprétation des résultats) ;
- demandes relatives au management de la qualité au CNRL, (procédures et démarches, gestion des non-conformités et/ou erreurs d'aiguillage des souches, etc.).

3/ Particuliers

- demandes de conseil de femmes enceintes (prévention, aliments à risque).

4/ 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.

Il est intéressant de souligner une forte demande pour les méthodes diagnostiques complémentaires à la culture par PCR. À noter que les demandes de particuliers portent essentiellement sur la prévention durant la grossesse. Les médecins du travail, les hygiénistes et les cliniciens posent souvent la question de l'intérêt d'une antibioprophylaxie en cas de situation à risque notamment chez une femme enceinte.

L'analyse des principales demandes sera poursuivie sur l'année 2008. Elle permettra au CNRL d'adapter le contenu des informations diffusées en intégrant les réponses aux demandes les plus fréquentes (mise à jour des informations sur le site Internet, contenu du bulletin d'information annuel, thématique de revues générales à destination des professionnels de santé et, le cas échéant, de proposer et de développer de nouveaux outils pour le diagnostic des cas de listériose et le typage moléculaire des souches, etc.).

→ En 2007, le CNRL a été contacté par des médecins du travail ou des hygiénistes concernant la circulation de denrées alimentaires type salade de hareng qui contenait des *L. monocytogenes* ne répondant pas aux critères microbiologiques réglementaires. Aucun cas humain déclaré n'étant lié à ces denrées alimentaires non-conformes. Ces professionnels de Santé ne savaient pas comment gérer ce problème : quel service de l'Etat contacter ; Quelle information diffuser ; Quelle responsabilité ?

Le CNRL a indiqué à ces hôpitaux que la détection et l'énumération des *L. monocytogenes* même en milieu hospitalier dans le cadre des autocontrôles des aliments doivent suivre les méthodes et du règlement européen EC 2073/2005. L'hôpital doit respecter l'HACCP en intégrant le danger *L. monocytogenes* pour la restauration des services à risques ou en incluant ces exigences dans le cahier des charges du sous-traitant pour la restauration de l'hôpital. Il a également averti la Cellule *Listeria* de ces demandes et a demandé une intervention de la DGS. La DGS (bureau des aliments) va envoyer une note à tous les établissements hospitaliers ainsi qu'aux CCLIN pour leur rappeler le cadre réglementaire des autocontrôles et les règles d'analyse en hygiène alimentaire.

4.3 EXPERTISE

Dans le cadre de son expertise sur *Listeria*, les responsables du CNRL peuvent être amenés à participer à des réunions au niveau national ou international en temps qu'experts. Par ailleurs, le CNR est régulièrement sollicité pour des demandes ponctuelles d'expertise sur des dossiers spécifiques concernant des cas de listériose ou le typage moléculaire de souches isolées de l'environnement ou d'aliments.

Expertises de souches

En 2007, le CNRL a reçu 10 souches isolées de patients (4 envois), adressées par des laboratoires de biologie médicale de pays pour lesquels il n'existe pas de centralisation des souches dans le

cadre d'un système de surveillance (cf. chapitre 2.3.1.).

Le CNRL a également reçu 107 souches d'origine environnementale et/ou alimentaire, adressées par des laboratoires d'hygiène et de contrôle des aliments pour leur identification et leur caractérisation (cf. chapitre 2.3.1.).

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

En 2007, les responsables du CNRL ont contribué à la révision des normes internationales et européennes pour les *Listeria* en microbiologie des aliments.

Ils ont également expertisé une méthode de PCR multiplex à grand nombre d'amplimères (>45) dérivée de l'analyse du génome humain pouvant servir à la caractérisation fine de *L. monocytogenes*.

Enfin, ils ont conseillé des industriels sur des projets de développement de kits commerciaux pour *L. monocytogenes*.

Expertise de publications

En 2007, un responsable du CNRL était correcteur et membre de comité de rédaction de journaux tel qu'Eurosurveillance, Journal of Food Protection, International Journal of Food Microbiology, Journal of Analytical Methods, etc. Dans ce cadre, 10 publications sur *L. monocytogenes* ont été corrigées en 2007.

Expertises dans des comités nationaux, européens ou internationaux

Les responsables du CNRL sont membres de plusieurs instances en tant qu'experts ou conseillers (*Steering Committee* de PulseNet Europe (réseau Med-Vet-Net), « curator » de la base de données du réseau PulseNet Europe, groupe de travail permanent de la Coordination des Laboratoires de Référence et d'Expertise (CLRE, Institut Pasteur), Réseau de Microbiologistes Médicaux (R2M), Président du Comité Européen de Normalisation en microbiologie des aliments CEN TC275/WG6, membre du comité français Afnor V08B et du comité International de normalisation en microbiologie des aliments, membre du comité d'experts spécialisés CES Microbiologie de l'AFSSA, etc).

Conseil auprès de Ministère

En Novembre 2007, un responsable du CNRL a conseillé la DGCCRF sur les prélèvements alimentaires à effectuer dans le cadre de son plan de surveillance *Listeria* 2008 à la demande du représentant de la DGCCRF de la Cellule *Listeria*.

4.4 RETOUR D'INFORMATIONS

Compte-rendu d'analyses

La surveillance microbiologique de la listériose en France est basée sur l'envoi volontaire et centralisé au CNR des *Listeria* (Institut Pasteur) des souches isolées de patients. De plus l'ensemble des souches envoyées par les laboratoires d'hygiène et de contrôle des aliments

(quelque soit le motif) nous permet de constituer une base de donnée de profils de souches utile pour les investigations autour de cas de listériose.

Il est donc primordial de pouvoir pérenniser ces réseaux de microbiologistes. C'est pourquoi nous sommes attachés à l'envoi au laboratoire expéditeur d'un compte-rendu détaillé des analyses effectuées sur les souches envoyées et ce dans les plus brefs délais. Il s'agit de l'un de nos objectifs Qualité pour l'année 2008 dans le cadre de l'amélioration continue de nos services.

Concernant les souches d'origine non humaine, ce délai est beaucoup plus hétérogène puisque les analyses effectuées varient selon les demandes des laboratoires (résultats d'identification et de sérotypie ou de groupage par PCR avec ou sans profils de macrorestriction d'ADN). Par ailleurs, les analyses de souches d'origine humaine, d'alertes sanitaires et d'investigations autour de cas sont prioritaires par rapport à toutes autres demandes de prestation allongeant de fait l'envoi des comptes-rendus de ces autres demandes. Les résultats de typage moléculaire concernant des souches reçues dans le cadre d'investigations épidémiologiques, appartenance ou pas au clone investigué, sont uniquement adressés aux membres de la Cellule « *Listeria* ».

Diffusion d'informations ciblées

Par ailleurs, nous sommes conscients que la diffusion d'informations épidémiologiques ciblées à nos différents correspondants permet de les motiver et de les sensibiliser sur l'importance d'un tel système de surveillance. Leur participation active est garante d'une plus grande exhaustivité des déclarations et des envois de souches de *L. monocytogenes*.

En 2007, le rapport d'activité pour l'année 2006 a été adressé à tous les institutionnels investis dans la surveillance de la listériose ainsi qu'à toute personne en faisant la demande. Le présent rapport d'activité pour l'année 2007 sera adressé sous une forme synthétisée à l'ensemble de notre réseau de correspondants des laboratoires de biologie médicale et des laboratoires d'hygiène et de contrôle des aliments. Il sera par ailleurs mis en ligne sur le site Internet du CNR en lien avec celui de l'Institut de Veille Sanitaire.

En 2007, il s'efforcera de réaliser des synthèses sous forme de publications en langue française afin de diffuser une information ciblée aux professionnels de santé (sages-femmes, gynécologue, généraliste, pédiatre, hygiéniste hospitalier, etc.) sur un bilan de la listériose en France en 2007.

5 TRAVAUX DE RECHERCHE EN LIEN DIRECT AVEC L'ACTIVITE DU CNR

Le Laboratoire des *Listeria* qui accueille le CNR des *Listeria* est une entité de recherche pasteurienne. À ce titre il participe aux 3 missions de l'Institut Pasteur : Expertise et Santé Publique, Enseignement et Recherche. Le Laboratoire a été rattaché en février 2006 au département du campus « Infection & Epidémiologie ». Ce département regroupe l'ensemble des structures de recherche pasteurienne dont la thématique comporte une dimension médicale et de santé publique.

Au cours des prochaines années, le Laboratoire des *Listeria* souhaite poursuivre ses travaux collaboratifs portant notamment sur l'étude de la biodiversité et la physiopathologie, mais aussi accentuer ses efforts afin d'améliorer la rapidité ainsi que la fiabilité du diagnostic des cas de listériose ainsi que leur prise en charge thérapeutique.

Les méthodes en développement déjà cités dans le chapitre 2.1.1.2. ne seront pas décrites à nouveau dans ce chapitre.

5.1 CONTRIBUTIONS AUX ETUDES EPIDEMIOLOGIQUES

5.1.1 SURVEILLANCE DE LA LISTERIOSE EN FRANCE 2000-2004 : EVALUATION DES CRITERES D'INVESTIGATION DES CAS GROUPES.

Responsables du projet au CNRL : A. Le Monnier - C. Jacquet

En collaboration avec l'Institut national de Veille Sanitaire (V. GOULET) et Division of Environmental Health Sciences, University of Minnesota School of Public Health, Minneapolis, MN, USA (C. Hedberg).

Présentation orale « Surveillance of listeriosis in France 2000-2004: Evaluation of cluster investigation criteria » au 16th International Symposium On Problems Of Listeriosis (ISOPOL), Savannah, USA (<http://www.aphl.org/conferences/proceedings/Pages/ISOPOLXVI.aspx>), mars 2007.

Le typage moléculaire de *L. monocytogenes* (LM) est indispensable pour identifier les cas groupés de listérioses. Cette étude est centrée sur les caractéristiques de ces cas groupés pour prédire la probabilité d'identifier une source commune de contamination.

Les cas de listérioses notifiés à l'InVS et les isolats de LM soumis au CNRL de 2000 à 2004 ont été étudiés. Les cas groupés, appelés signalement, étaient définis par 3 ou plus d'isolats durant une période de 14 semaines avec des profils PFGE similaires en utilisant à la fois *AscI* et *ApaI*. Le CNRL les signale alors à l'InVS, qui initie des investigations. Une origine commune était identifiée par l'isolement d'une même souche à partir d'échantillons de denrées alimentaires consommées par les cas, ou épidémiologiquement en impliquant un produit spécifique ou une denrée alimentaire.

L'analyse rétrospective de tous les cas groupés de listériose signalés par le CNRL entre 2000 et 2004 [n=46, soit 323 cas, dont 11 avec une source commune identifiée (125 cas)] a permis de redéfinir les critères de signalement.

Les résultats de cette étude suggèrent une approche en 2 temps : 1) si 3 cas groupés sont identifiés durant une période de 6 semaines le CNR signale les cas à l'InVS pour accentuer les investigations des cas ; 2) si 6 cas sont identifiés, l'InVS coordonne des investigations épidémiologiques, environnementales et microbiologiques complémentaires afin d'identifier la source de contamination. Ces nouveaux critères appliqués aux 46 épisodes montrent une sensibilité de 100%, une spécificité accrue à 74 % et une valeur prédictive positive de 55 %. Ces critères permettent de réduire le nombre d'investigations improductives en concentrant les efforts des pouvoirs publics sur les cas les plus critiques.

5.1.2 AUGMENTATION DU NOMBRE DE CAS FRANÇAIS DE LISTERIOSES

Responsables du projet au CNRL : A. Le Monnier - A. Leclercq

Sous la coordination de l'InVS (V. GOULET et H. de Valk) et en collaboration avec la Division of Environmental Health Sciences, University of Minnesota School of Public Health, Minneapolis, MN, USA (C. Hedberg)

Article accepté dans Emerging Infectious Disease en 2008. V. Goulet, C. Hedberg, A. Le Monnier et H. De Valk. Listeriosis in France in a context of increasing incidence in European countries.

Présentations orales aux 4^{ème} Journées des CNR, 22 Novembre 2007, Charenton, « Recrudescence de la listériose en France et en Europe », A. Le Monnier et V. Goulet ; et au réseau Listeria le 5 décembre 2007, Institut Pasteur, Paris.

L'incidence de la listériose en France a décliné de 4,5 à 3,5 cas par million d'habitants de 1999 à 2005. En 2006, elle a augmenté à 4,7 cas par million d'habitants/an. Une investigation épidémiologique étendue des cas groupés en France n'a pas montré la présence d'épidémies alimentaires mais il s'agit bien d'une augmentation des cas sporadiques. En outre, aucune augmentation n'est constatée pour les cas associés aux femmes enceintes, ou pour les personnes de moins de 60 ans sans maladie sous-jacente. Cette augmentation concerne principalement les personnes de plus de 60 ans et apparaît être plus prononcée pour les plus de 70 ans.

D'après le rapport annuel EFSA-ECDC sur les infections transmissibles de l'animal à l'homme, le nombre de cas de listériose chez l'homme est également en hausse de 8,6% au sein de l'Union Européenne passant de 1427 cas en 2005 à 1583 cas en 2006, le nombre de cas pour 100000 habitants ayant grimpé de 59% au cours des cinq dernières années. L'incidence européenne est de 0,33 cas par 100000 habitants. 56% des infections à *Listeria* se produisent chez des sujets de plus de 65 ans.

Les causes de cette augmentation restent inconnues et les différentes hypothèses sont investiguées au sein de la Cellule *Listeria*:

- L'augmentation des dates limites de consommation,
- L'augmentation du temps de conservation dans le réfrigérateur ménager,
- Les nouveaux produits dans la gamme des produits transformés frais (rayon traiteur),
- Réduction du sel dans les aliments tels que les jambons blancs,
- La modification de la réglementation européenne (Règlement EC 2073/2005) et mise en place du paquet hygiène (Arrêté du 8 juin 2006),
- Le changement des habitudes alimentaires des personnes de plus de 60 ans,
- Les effets de nouveaux traitements thérapeutiques particuliers, etc.

5.1.3 TRAÇABILITE DES ISOLATS DE *L. MONOCYTOGENES* DES INDUSTRIES LAITIÈRES DU LAIT DE BREBIS EN SARDAIGNE

Responsables du projet au CNRL : A. Le Monnier - M. Ragon

En collaboration étroite et sous la direction du Dipartimento di Biologia Animale, Università degli Studi di Sassari, Italie (A.L. Pilo, C. Spanu, C. Scarano).

Présentation sous forme de poster «Tracing Listeria monocytogenes isolates from ewe's dairy plants » au 16th International Symposium On Problems Of Listeriosis (ISOPOL), mars 2007, Savannah, USA.

La persistance de *L. monocytogenes* (Lm) dans l'environnement industriel mène à la contamination des aliments produits et constitue un problème récurrent dans les industries laitières. L'objet de cette étude a été de tracer les contaminations croisées à LM dans les industries de transformation du lait de brebis en utilisant la caractérisation moléculaire des souches. Cette étude a inclus 10 usines de fromages de brebis en Sardaigne. Des échantillons ont été collectés des différentes étapes de fabrication de fromages (*pecorino romano* et *ricotta*), de surfaces industrielles en contact ou non avec les fromages. Les souches de Lm ont été caractérisées par PFGE en utilisant les enzymes *AscI* et *ApaI*. Les souches de Lm ont été isolées de 48 échantillons (18,8%) de 9 usines sur les 10 investiguées. Lm a été détecté dans les échantillons des filtres du lait cru (16,7%), de croûtes de fromage (5,4%), de surfaces de ricotta affiné (18,2%), des moules à fromage (20%), des tables et des plateaux (4 cas, 9,8%), des machines à laver les fromages (60%), des machines à laver la ricotta (20%), des conduites ou des surfaces des murs/sols (19,4%). Le gène *ActA* a été détecté dans toutes les souches Lm. Les sérotypes montrent la distribution suivante : 1/2a (63,1%), 4b (22,4%), 1/2b (10,6%), et 1/2c (3,9%). L'analyse PFGE des souches montra 23 pulsotypes différents. Chaque fromagerie était colonisée par différents pulsotypes (2 à 4) excepté pour une usine qui était contaminée par un seul sérotype. L'analyse des sérotypes révéla que la contamination par Lm des croûtes de fromages et des fromages ricotta était due à l'environnement des ateliers des usines. Par contre, les souches du lait cru appartenaient à des pulsotypes différents, suggérant que le traitement thermique du lait était efficace contre l'introduction de Lm dans l'usine. Ceci a permis également d'identifier des zones critiques permettant les contaminations croisées dans chaque usine. La maîtrise de Lm lors du processus de fabrication constitue un moyen efficace et utile dans le but d'améliorer l'efficacité des mesures préventives.

5.2 METHODES DE DIAGNOSTIC ET ATYPIES DES SOUCHES

5.2.1 UNE NOUVELLE ESPECE AVIRULENTE ET ENVIRONNEMENTALE DE *LISTERIA : L. ROCOURTI*

*Responsables du projet au CNR : A. Leclercq - V. Cadet Daniel - A. Le Monnier
En collaboration avec l'ancienne unité de P. Grimont de l'Institut Pasteur*

Une nouvelle espèce de *Listeria*, *Listeria rocourtii*, non virulente pour l'homme et adaptée à l'environnement a été isolée de salades en Autriche. Le CNRL a constaté que cette espèce présentait des caractères phénotypiques atypiques qui ne permettaient pas son isolement facile par les méthodes classiques de recherche des *Listeria* mais nécessitant l'utilisation de la biologie moléculaire.

5.3 ETUDE DE LA VIRULENCE

5.3.1 ETUDE DE LA TRAVERSEE DE LA BARRIERE PLACENTAIRE PAR *L. MONOCYTOGENES*

*Responsable du projet au CNRL : S. Grayo – A. Le Monnier
En collaboration et sous la direction de M. Lecuit*

L'équipe de M. Lecuit a mis au point un nouveau modèle transgénique obtenu par knock-in, exprimant une E-cadherine modifiée (E16P) la rendant permissive à l'interaction avec InlA. Nous avons pu modéliser l'infection fœtoplacentaire chez cette nouvelle lignée murine, et découvrir le mécanisme de translocation de *Listeria monocytogenes* à travers la barrière placentaire.

5.3.2 ETUDE DE SOUCHES HYPOVIRULENTES ET VIRULENTES

*Responsable du projet au CNRL : A. Le Monnier - M. Ragon - A. Leclercq
En collaboration avec INRA UR 918 Pathologie infectieuse et Immunologie, tours (Sylvie Roche et Philippe Velge)*

Dans le cadre d'un projet INRA, plusieurs souches avirulentes ou hypovirulentes ont été détectées dans un modèle déjà publié de plage de lyse et d'inoculation à la souris (ref Roche). La caractérisation de ces souches inclut leur typage moléculaire (groupe PCR, pulsotype, ..) le séquençage des gènes codant les principaux facteurs de virulence (LLO, ActA, InlA, PlcB,...). Par ailleurs, le CNRL a inclus ces souches dans sa base de données MLST afin de pouvoir analyser les processus évolutifs ayant conduit à la sélection de ces souches comparativement aux

données disponibles pour un nombre important de souches virulentes de *L. monocytogenes* isolées notamment de cas de listériose.

5.4 DEVELOPPEMENT DE NOUVEAUX TESTS DIAGNOSTIQUES

Le diagnostic de listériose est microbiologique et *L. monocytogenes* n'est pas une bactérie à croissance difficile. Cependant, dans certaines situations (antibiothérapie préalable, situation où les prélèvements ne sont pas réalisables ou dans le cas de diagnostic rétrospectif), il est intéressant de pouvoir disposer d'outils diagnostiques complémentaires à la culture standard.

5.4.1 PCR QUANTITATIVE EN TEMPS REEL DU GENE *hly* POUR LE DIAGNOSTIC ET LA GESTION DE *L. MONOCYTOGENES*

Responsable du projet au CNRL : A. Le Monnier

En collaboration avec le laboratoire de Microbiologie de l'Hôpital Necker-Enfants Malades (E. Abachin, P. Berche, S. Kayal)

Le laboratoire de microbiologie de l'hôpital Necker a développé une PCR en temps réel permettant de détecter et de quantifier l'ADN de *L. monocytogenes* dans les prélèvements biologiques (Le Monnier A., E. Abachin, B. Berche, and S. Kayal. 2004. Real-time PCR on *Listeria monocytogenes hly* gene: a complementary tool for the diagnosis of *Listeria* meningoencephalitis. Personal communication - 44 th ICAAC - Washington oct-nov 2004). Ce test a été évalué prospectivement sur une cohorte de plus de 300 liquides céphalo-rachidiens prélevés de patients avec une forte suspicion de listériose neuroméningée. Ce test permet d'améliorer la sensibilité du diagnostic de listériose notamment dans certaines situations cliniques comme le traitement antibiotique préalable. De plus, la quantification permet également le suivi de l'efficacité du traitement des patients (*présentation sous forme de poster au 16th International Symposium On Problems Of Listeriosis (ISOPOL), mars 2007, Savannah, USA*).

5.5 DEVELOPPEMENT DE NOUVEAUX OUTILS DE TYPAGE MOLECULAIRE

5.5.1 MULTILOCUS SEQUENCE TYPING OF *LISTERIA* POUR LA CARACTERISATION DES SOUCHES ET LEUR EVOLUTION GENETIQUE

Personnes responsables du projet au CNRL : A. Le Monnier - M. Ragon - L. Bellon

En collaboration avec la plate-forme de génotypage des pathogènes et santé publique IP-InVS (R. Lavenir, S. Brisse)

Présentation sous forme de poster au 16th International Symposium On Problems Of Listeriosis (ISOPOL), mars 2007, Savannah, USA. Finalisation d'un article en instance de soumission

La surveillance de la listériose requiert des méthodes de typage discriminantes et la compréhension de l'évolution des souches à un niveau global requiert des méthodes de typage reproductibles et standardisées. Le Multilocus Sequence Typing (MLST) combine un pouvoir discriminant élevé pour de nombreuses espèces microbiennes et génère des données standardisées qui sont riches en terme de phylogénie des souches et de leur évolution.

Nous avons réalisé une base de données MLST sur 7 gènes de ménage (*abcZ*, *blgA*, *cat*, *dapE*, *dat*, *ldh*, *lhkA*) sur une sélection de 178 souches non reliées épidémiologiquement provenant du CNRL et du CCOMS de la listériose d'origine alimentaire.

Comparée à la PFGE utilisant la combinaison *AscI* et *ApaI*, la MLST est moins discriminante (index de diversité de 99,2% et 97,4%, respectivement). L'utilisation des méthodes basées sur les séquences pour un typage fin des souches doit se fonder sur un nombre élevé de polymorphismes nucléotidiques non limité aux parties de gènes examinées dans notre système.

Comparée à la PFGE et au sérotypage, la MLST procure des informations nouvelles et complémentaires au sujet des relations phylogénétiques entre les souches. La combinaison de la diversité allélique des 7 gènes discrimine 65 types de séquences (STs) organisés en 10 complexes clonaux (famille de STs liés avec un critère de distance égal à 1) et 4 singletons. Bien que plus précise que le sérotypage, l'analyse phylogénétique des profils alléliques montre de plus un total accord avec les sérotypes. Nous avons constaté que les données de PFGE ne donnent pas d'information phylogénétique sur de longues périodes de temps, par le fait que les souches appartenant à des complexes clonaux uniques ne sont pas regroupés sur la base de la PFGE.

Nous pensons que la MLST est appropriée pour révéler de telles relations entre les souches en utilisant d'autres souches de diverses origines, ce qui sera entrepris en 2008.

5.5.2 BIODIVERSITE ET ETUDE PHYLOGENETIQUE DES POPULATIONS DE *LISTERIA*

Personnes responsables du projet au CNRL : A. Le Monnier - M. Ragon

En collaboration avec la plate-forme de génotypage des pathogènes et santé publique IP-InVS (S. Brisse)

Présentation sous forme de poster au 16th International Symposium On Problems Of Listeriosis (ISOPOL), mars 2007, Savannah, USA. Finalisation d'un article en instance de soumission

La MLST génère des informations complémentaires concernant les liens de parenté entre les souches. Le CNRL a utilisé cette technique pour comprendre l'évolution phylogénique des souches à un niveau global (souches sélectionnées de différentes origines, sur une longue période de temps et en provenance de différents continents). L'ensemble des données rassemblées a également permis de constituer la première base de données de *Multilocus Sequence Typing* (MLST) ouverte et accessible en ligne à la communauté scientifique

<http://www2.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/> afin de favoriser les échanges et les collaborations internationales sur l'étude de la structure génétique des populations de *Listeria*. A ce jour, plusieurs utilisateurs (USA, Europe) utilisent cette base de données et des autorités de santé publique européenne ont demandé si elle pouvait intégrer cette base de données et appliquer le protocole de MLST dans ses laboratoires. Ces demandes seront probablement à l'origine de nouveaux travaux collaboratifs dans le domaine de l'étude de la structure génétique des populations de *Listeria*.

5.6 ETUDE DE LA RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES

L. monocytogenes est naturellement sensible aux principaux antibiotiques utilisés en clinique. Cependant, plusieurs phénomènes inquiétants concernant la sensibilité des souches à certains antibiotiques semblent émerger, motivant la recherche et la validation de nouvelles alternatives thérapeutiques au traitement de référence actuel.

L. monocytogenes est rarement résistante aux antibiotiques. Cependant, plusieurs études soulignent des phénomènes émergents. Le transfert horizontal de gènes de résistance est reporté entre les espèces de *Listeria* et d'autres micro-organismes (*Staphylococcus*, *Streptococcus* and *Enterococcus spp.*) habituellement résistants à de très nombreux antibiotiques d'intérêt clinique (ref Charpenbtier AAC 1999). Ceci pourrait conduire à l'émergence de résistance chez *L. monocytogenes* y compris à des antibiotiques classiquement utilisés dans le traitement de la listériose. De plus plusieurs études ont récemment rapporté une augmentation du taux de résistance à un ou plusieurs antibiotiques, y compris l'ampicilline (Srinivasan, Foodborne pathog Dis 2005), parmi les souches isolées de l'environnement (Charpentier AAC 1995) et plus rarement parmi les souches isolées de patients.

Ces études soulignent la nécessité de surveiller la sensibilité des souches de *L. monocytogenes*. Le CNRL étudie chaque année depuis 1992 la sensibilité des souches cliniques aux antibiotiques d'intérêt. Cependant, à ce jour, il n'existe pas de données de synthèse sur les souches françaises contrairement à d'autres pays. C'est pourquoi en 2007, le CNRL en collaboration avec le CNR des agents antibactériens a entrepris de synthétiser les données concernant l'ensemble des souches résistantes isolées de patients depuis 1992 (description des différents profils de sensibilité, des données de typage moléculaire, et des mécanismes de résistances caractérisés ...).

5.7 VALIDATION DE NOUVELLES THERAPEUTIQUES

Malgré l'utilisation d'antibiotiques actifs contre *L. monocytogenes*, la listériose est encore associée à un important taux de mortalité, notamment dans les cas d'infection neuro-méningées. C'est pourquoi certains auteurs ont suggéré que le traitement de référence de la listériose pouvait être optimisé (Hof 1997 la revue). De plus, l'émergence potentielle de résistance doit être anticipée en validant de nouvelles alternatives thérapeutiques.

5.7.1 ACTIVITES COMPAREES DE LA MOXIFLOXACINE ET DE L'AMOXICILLINE CONTRE LA CROISSANCE INTRACELLULAIRE DE *LISTERIA MONOCYTOGENES*

Personnes en charge du projet au CNRL : A. Le Monnier - S. Grayo

En collaboration avec l'Unité INSERM U570, Faculté de Necker, Paris (O. Join-Lambert), le Service de Pharmacie, Hôpital Necker-Enfants Malades (AP-HP), Paris (M.C. Desroches).

Présentation sous forme de poster au 16th International Symposium On Problems Of Listeriosis (ISOPOL), mars 2007 Savannah, USA

Un article accepté pour publication dans AAC (mai 2008)

Listeria monocytogenes est une bactérie intracellulaire facultative à l'origine d'infections sévères. Le traitement de référence actuel de la listériose repose sur l'administration de hautes doses d'amoxicilline. Néanmoins, le taux de mortalité de la listériose en France reste élevé malgré cette antibiothérapie.

Cet échec thérapeutique souligne la nécessité de développer de nouvelles alternatives afin d'améliorer le pronostic vital des patients infectés par *Listeria monocytogenes*. La moxifloxacinine, une nouvelle fluoroquinolone, présente des propriétés intéressantes contre les bactéries à Gram négatif mais également sur les bactéries à Gram positif, comme *Listeria monocytogenes*.

Afin d'évaluer l'efficacité de la moxifloxacinine contre *Listeria monocytogenes*, nous avons mené une approche épidémiologique, puis une approche expérimentale.

La concentration minimale inhibitrice (CMI) de la moxifloxacinine a été déterminée à partir d'un échantillon de souches de *Listeria monocytogenes* d'origines variées : humaines (n=205), alimentaires et environnementales (n=183), sélectionnées sur l'ensemble de l'année 2005.

In vitro, l'activité de la moxifloxacinine est comparée à celle de l'amoxicilline sur les formes extracellulaires de *Listeria monocytogenes* EGDe (en milieu liquide) ; puis, dans un modèle de cultures primaires de cellules de moelle osseuse de souris BALB/c infectées par *Listeria monocytogenes* EGDe.

5.7.2 EFFICACITE DE LA MOXIFLOXACINE DANS LES INFECTIONS DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL PAR *LISTERIA MONOCYTOGENES*

Personnes en charge du projet au CNRL : A. Le Monnier - S. Grayo

En collaboration avec l'Unité INSERM U570, Faculté de Necker, Paris (O. Join-Lambert), le Service de Pharmacie, Hôpital Necker-Enfants Malades (AP-HP), Paris (M.C. Desroches, R. Respaud, E. Singla) et l'Unité des Interactions Bactéries-Cellules, Institut Pasteur, Paris (O. Dussurget)

Présentation sous forme de poster au 16th International Symposium On Problems Of Listeriosis (ISOPOL), mars 2007 Savannah, USA

Article soumis pour publication.

L. monocytogenes est une bactérie intracellulaire facultative responsable d'infections sévères du système nerveux central dont le pronostic reste réservé malgré un traitement antibiotique. La moxifloxacine est une nouvelle fluoroquinolone qui présente une activité bactéricide *in vitro* sur les formes extracellulaire et intracellulaire de *L. monocytogenes*. Nous avons évalué l'activité *in vitro* puis *in vivo* de la moxifloxacine afin de justifier son utilisation dans le traitement des infections neuro-méningées par *L. monocytogenes*.

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) de la moxifloxacine ont été déterminées sur une collection de souches environnementales et cliniques de *L. monocytogenes* (CNR des *Listeria*). L'efficacité de la moxifloxacine a été comparée à celle de l'amoxicilline *in vitro* en milieu liquide et dans un modèle de macrophages dérivés de cellules de moelle osseuse de souris et enfin dans un modèle d'infection du système nerveux central chez la souris en utilisant la souche EGDe.

La moxifloxacine présente une CMI médiane de 0.5 µg/ml [0.064-1] quelle que soit l'origine des souches testées. Aucune résistance croisée n'a été détectée avec des souches résistantes à la ciprofloxacine.

In vitro, en milieu liquide, la moxifloxacine et l'amoxicilline sont bactéricides. Cependant la moxifloxacine est rapidement efficace dès les premières heures. De plus, elle apparaît rapidement bactéricide sur les réservoirs intracellulaires de la bactérie alors que l'amoxicilline n'est que bactériostatique.

In vivo, suite à l'administration d'une même dose de moxifloxacine ou d'amoxicilline (50 mg/kg, i.p.), on observe un retard significatif de la mort des animaux infectés ($P \leq 0,0002$), s'expliquant par une réduction rapide des comptes bactériens déterminés dans le sang et dans les organes (cerveau, foie et rate). Cette activité est corrélée à la présence de la moxifloxacine retrouvée précocement dans le parenchyme cérébral dès la 5^{ème} minute après son injection. Le pic est quant à lui obtenu une heure après injection chez la souris infectée (1,95±/± 0,32 µg/g cerveau).

L'ensemble de ces données suggère que la moxifloxacine constitue une alternative de choix dans le traitement des listérioses neuro-méningées.

5.7.3 MODIFICATION DE LA PHARMACOCINETIQUE D'UN ANTIBIOTIQUE DUE A L'INFECTION PAR *L. MONOCYTOGENES*

Personnes en charge du projet au CNRL : A. Le Monnier - S. Grayo

En collaboration avec le Service de Pharmacie, Hôpital Necker-Enfants Malades (AP-HP), Paris (M.C. Desroches, S. Dubouch, R. Respaud, E. Singlas)

Présentation sous forme de poster au 16th International Symposium On Problems Of Listeriosis (ISOPOL), mars 2007, Savannah, USA. Article en cours de rédaction.

Les infections par *L. monocytogenes* sont rares mais peuvent engager le pronostic vital. Leur traitement repose sur une antibiothérapie débutée précocement et rapidement efficace. La

moxifloxacin a récemment prouvée son efficacité *in vitro* et *in vivo* dans un modèle d'infection neuro-méningée chez la souris.

L'objectif est d'étudier le profil pharmacocinétique de la moxifloxacin dans un modèle murin présentant une infection cérébrale par *L. monocytogenes* grâce à la mise au point d'une méthode de dosage en CLHP.

L'étude *in vivo* à consister à traiter des souris infectées et à les comparer à des souris témoins non infectées. L'injection unique de la moxifloxacin (50 mg/kg) est réalisée 36 heures après leur infection par un inoculum de 1×10^5 CFU bactéries. Les prélèvements ont été réalisés à T0, 5, 15, 30, 60 et 120 minutes après injection (6 souris par temps). Le dosage de la moxifloxacin consiste en une méthode CLHP en phase inverse, couplée à une détection spectrofluorimétrique. Cette technique a été mise au point et validée dans le plasma et le cerveau. L'aire sous la courbe (ASC) de la moxifloxacin a été déterminée à partir des concentrations dans le plasma et le cerveau.

Chez la souris saine, la moxifloxacin diffuse rapidement dans le parenchyme cérébral (5 minutes après injection ; T_{max}=1 heure ; C_{max}=781 ng/g de cerveau). Chez les animaux infectés, la cinétique plasmatique montre une concentration plus importante que chez les témoins (ASC infectées/témoins=2,8). Cette différence peut s'expliquer par l'hypovolémie due à l'état de choc septique. De plus, les concentrations cérébrales retrouvées sont également augmentées en cas d'infection (ASC infectées/témoins=2,5 ; T_{max}=1 heure ; C_{max}=1952 ng/g de cerveau). Cette différence semble due à l'augmentation de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique due à l'inflammation provoquée par l'infection.

Le dosage de la moxifloxacin a permis de montrer sa diffusion cérébrale mais également des différences cinétiques en cas d'infection par *L. monocytogenes*. Lors d'un traitement par moxifloxacin, cette technique de dosage permettrait de nombreuses applications dans le suivi thérapeutique ou l'étude du tropisme tissulaire, y compris pour d'autres infections.

5.8 PROJETS COLLABORATIFS

Enfin, grâce à son expertise dans le domaine de *Listeria* et de la listériose, le laboratoire des *Listeria* est associé à de nombreux travaux collaboratifs :

- avec des entités de l'Institut Pasteur :
 - Unité des Interactions Bactéries Cellules (P. Cossart): Travaux sur la virulence des *Listeria*,
 - Plate-Forme de Génotypage des Pathogènes et Santé Publique (S. Brisse): Travaux de mise au point de nouvelles méthodes de typage moléculaire,
 - Unité des agents antibactériens (P. Courvalin): Etude moléculaire des résistances aux agents anti-*Listeria* et confirmation des résistances constatées au CNR des *Listeria* ;

- CeRBEP (D. Guillemot) / Unité de Recherche et d'Expertise Epidémiologie des Maladies Emergentes (A. Fontanet): Etude longitudinale de la base de données du CNR
 - Unité de Génétique des Génomes Bactériens (Ph. Glaser): étude de la diversité de *L.ivanovii subsp. ivanovii*
- d'autres équipes (Hôpitaux Necker et Cochin (APHP), INRA, Faculté vétérinaire de Sassari et de Bologne, Italie, etc.).

Les résultats de ces travaux sont encore préliminaires et ne seront donc pas présentés dans ce rapport.

Le réseau Listeria comprenant 12 laboratoires de recherche : un exemple de collaboration CNRL-Equipes de recherches extérieures

Depuis 2005, le "réseau Listeria" constitue un regroupement de compétences autour de différentes thématiques pour générer une meilleure connaissance du pathogène et de l'infection. Il est financé par le programme PNRA (programme national de recherche en alimentation et nutrition humaine) de l'Inra. Il s'agit en particulier d'étudier la variabilité des souches, les effets de la matrice alimentaire et les facteurs limitants qui contribuent à l'incertitude dans la description de la relation dose-réponse. Le réseau joue sur la complémentarité des équipes et des thématiques de recherche, facilite les transferts de connaissance et de matériel. Ses membres se réunissent au minimum deux fois par an pour échanger sur l'état d'avancement de leurs travaux :

1. un premier groupe réunit des compétences autour de l'étude de la capacité des bactéries à coloniser un aliment ou un support (équipes INRA de Clermont-Theix, d'Aurillac, de Lille et UMR-INRA d'Avignon, de Nantes, ENSIA de Massy, ENSBANA de Dijon) ou à coloniser et infecter l'hôte (équipes de l'INRA de Tours-Nouzilly et de l'Institut Pasteur de Paris dont le CNRL).
2. un autre groupe est spécialisé dans l'épidémiologie, le typage et l'étude de la biodiversité des souches (équipes de l'Institut Pasteur dont le CNRL, de l'AFSSA et de l'INVS).
3. un troisième axe de "sociologie du risque", développé par le Lesma de l'Ecole Audencia de Nantes, analyse les causes des peurs alimentaires et le comportement du consommateur dans la gestion des produits alimentaires dits "à risque", afin d'établir l'intérêt d'une communication plus ciblée. Des enquêtes s'attachent à déterminer l'état de l'information et de l'éducation du consommateur vis-à-vis de *L. monocytogenes* et de la listériose et l'impact de nouvelles informations scientifiques sur la perception du risque. Cet objectif est réalisé au travers d'entretiens individuels, de groupes de discussion (8-10 personnes) et d'une enquête nationale sur un échantillon représentatif de la population française (1000 personnes).

Le CNRL a participé activement à ces trois groupes de recherche lors de l'année 2007.

Etudes sociologiques

Le CNRL a répondu aux questions de l'équipe de recherche en sociologie de Jouy en Josas le 16 Mars 2007 sur l'Evaluation et la gestion du risque et en Novembre 2007 sur l'histoire de la *Listeria* et la Listériose et sa possibilité de point de départ pour la gestion du risque *Bacillus cereus*.

Il a également été interrogé par un sociologue allemand sur le gout des personnes pour la recherche en santé publique et est régulièrement interrogé par la SOFRES ou des organismes de sondage sur des questions relatives à son activité comme l'utilisation de l'anglais en recherche biomédicale.

5.9 CONCLUSION

Comme l'illustre ce chapitre du rapport, la recherche constitue une activité fondamentale de notre activité, qui se nourrit de notre activité de référence et vient également guider celle-ci. Elle comporte un volet de recherche appliquée, qui découle directement de notre activité de référence, et vise à améliorer les aspects techniques et diagnostiques.

S'y accole un volet plus fondamental, développé en lien avec la PF8, qui dérive de notre activité de caractérisation des souches *in vitro*, au plan génotypique et phénotypique : il vise à mieux comprendre le profil évolutif et la variabilité intra- et inter-spécifique de *L. monocytogenes*. Cette approche devrait nous permettre d'identifier les spécificités des souches cliniques par rapport aux souches environnementales et notamment alimentaires.

Enfin, un troisième volet concerne les aspects physiopathologiques, qui sont étudiés en lien avec les unités de l'Institut travaillant sur *Listeria*, et sont développés dans l'esprit d'un continuum le plus concret possible entre activités cliniques, microbiologiques, épidémiologiques et fondamentales (bedside to bench & bench to bedside).

6 LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

6.1 PUBLICATIONS NATIONALES

- **Jacquet, C., J. Rocourt, P. Martin.** 2007. *Listeria* et listériose. IN : Précis de Bactériologie clinique 2^e édition. J. Freney, F. Renaud, R. Leclercq et P. Riegel (eds). Editions ESKA, Paris.
- **A. Le Monnier.** 2007. Chapitre 40 : Sérodiagnostic de la listériose. REMIC. Editions SFM, Paris.

6.2 PUBLICATIONS INTERNATIONALES

- **Hong, E., M. Doumith, S. Duperrier, I. Giovannacci, A. Morvan, P. Glaser, C. Buchrieser, C. Jacquet and P. Martin.** "Genetic diversity of *Listeria monocytogenes* recovered from infected persons and pork, seafood and dairy products on retail sale in France during 2000 and 2001." Int J Food Microbiol. 2007, **10**, 187-94
- Bou-M'handi N, **Jacquet C**, El Marrakchi A, **Martin P**. Phenotypic and Molecular Characterization of *Listeria monocytogenes* Strains Isolated from a Marine Environment in Morocco. Foodborne Pathog Dis. 2007, **4**, 409-17.
- **Hamdi TM, Naïm M, Martin P, Jacquet C.** Identification and molecular characterization of *Listeria monocytogenes* isolated in raw milk in the region of Algiers (Algeria). Int J Food Microbiol. 2007, **116**, 190-3.
- **Le Monnier A**, Autret N, Join-Lambert OF, Jaubert F, Charbit A, Berche P, and Kayal S. ActA is required for crossing of the fetoplacental barrier by *Listeria monocytogenes*. Infect Immun. 2007, **75**, 950-7.
- Hain T, Chatterjee SS, Ghai R, Kuenne CT, Billion A, Steinweg C, Domann E, Kärst U, Jansch L, Wehland J, Eisenreich W, Bacher A, Joseph B, Schär J, Kreft J, Klumpp J, Loessner MJ, Dorscht J, Neuhaus K, Fuchs TM, Scherer S, Doumith M, **Jacquet C, Martin P**, Cossart P, Rusniok C, Glaser P, Buchrieser C, Goebel W, Chakraborty T. Pathogenomics of *Listeria* spp. Int J Med Microbiol. 2007, **297**, 541-57.

6.3 COMMUNICATIONS NATIONALES

- Journée GPH: Towards new therapeutics against low GC% Gram-positive bacteria : Analysis of the molecular and cellular basis of virulence, 05 Novembre 2007, Institut Pasteur, Paris, “Traversée de la barrière materno-foetale par *Listeria monocytogenes*”, S. Grayo.
- 4^{ème} Journée des CNR, 22 Novembre 2007, Charenton, « Recrudescence de la listériose en France et en Europe », A. Le Monnier et V. Goulet (InVS).
- 27^e Réunion interdisciplinaire de chimiothérapie anti-infectieuse (RICAI), Conférence sur invitation, 06 décembre 2007, Paris, « *Listeria* et listériose : des animaux d'élevage à nos assiettes », A. Le Monnier.
- Réunion annuelle du réseau *Listeria*, Institut Pasteur, Paris, « Recrudescence de la listériose en France et en Europe », A. Le Monnier et V. Goulet (InVS).
- Comité Français de Normalisation en Microbiologie des Aliments V08B – Avis d'experts sur la révision de la norme ISO 11290 Partie 1 et 2 *Listeria monocytogenes*, A. Leclercq
- 27^e Réunion interdisciplinaire de chimiothérapie anti-infectieuse (RICAI), Conférence sur invitation, 06 décembre 2007, Paris, « *Listeria* et listériose : des animaux d'élevage à nos assiettes », A. Le Monnier.

6.4 COMMUNICATIONS INTERNATIONALES

- Participation aux Comités Européen CEN TC275/WG6 et international ISO TC34/SC9 de normalisation en Microbiologie des aliments et de l'environnement. LeCaire, Egypte. Avril 2007. A. Leclercq.
- Présentation orale « *Surveillance of listeriosis in France 2000-2004: Evaluation of cluster investigation criteria* ». C. Hedberg, **Ch. Jacquet**, V. Goulet. 20-23 March 2007. The 16th International Symposium on Problems of Listeriosis, Savannah, USA.
- Poster « *An interlaboratory quality assay of Listeria monocytogenes Pulsed-field gel electrophoresis in the frame of PulseNet Europe Certification* ». A. Brisabois, A. Kérouanton, **Ch. Jacquet**, C. Lucas, R. Hendriksen, S. Lukinmaa, et le Study Group of the European Quality Assurance System. 20-23 March 2007. The 16th International Symposium on Problems of Listeriosis, Savannah, USA.
- Poster « *Comparative activities of Moxifloxacin and Amoxicillin against intracellular growth of Listeria monocytogenes* ». **S. Grayo**, O. Join-Lambert, M.C. Desroches et **A. Le Monnier**. 20-23 March 2007. The 16th International Symposium on Problems of Listeriosis, Savannah, USA.

- Poster « *Modification of antibiotic pharmacokinetics due to Listeria monocytogenes* ». **S. Grayo**, R. Respaud, M.C. Desroches, S. Dubouch et **A. Le Monnier**. 20-23 March 2007. The 16th International Symposium on Problems of Listeriosis, Savannah, USA.
- Poster « *Moxifloxacin is superior to reference treatment in a murine model of central nervous system infection by Listeria monocytogenes* ». **S. Grayo**, R. Respaud, M.C. Desroches, O. Dussurget, E. Singlas et **A. Le Monnier**. 20-23 March 2007. The 16th International Symposium on Problems of Listeriosis, Savannah, USA.
- Poster « *Quantitative Real-Time PCR on hly-gene for the diagnosis and management of Listeria monocytogenes infections* ». **A. Le Monnier**, S. Blanot, E. Abachin, P. Berche et S. Kayal. 20-23 March 2007. The 16th International Symposium on Problems of Listeriosis, Savannah, USA.
- Poster « *Tracing Listeria monocytogenes isolates from ewe's dairy plants* ». A.L. Pilo, **A. Le Monnier**, C. Spanu, **M. Ragon**, C. Scarano, et E.P.L. De Santis. 20-23 March 2007. The 16th International Symposium on Problems of Listeriosis, Savannah, USA.
- Poster « *Multilocus sequence typing of Listeria for strain characterization and evolution* ». **M. Ragon**, R. Lavenir, **L. Bellon**, **A. Le Monnier**, S. Brisse. 20-23 March 2007. The 16th International Symposium on Problems of Listeriosis, Savannah, USA.

6.5 CONFÉRENCES SUR INVITATIONS

- Présentation de Pulsenet Europe, 15^{ème} congrès du Comité européen en Microbiologie des Aliments section microbiologie, Le Caire (Egypte), 29 Avril 2007, A. Leclercq
- Conférence « Nouveaux outils pour la surveillance épidémiologique des cas de listériose et l'étude de la biodiversité des populations de *Listeria* », INRA de NOUZILLY, 26 Janvier 2007, A. Le Monnier
- Conférence « Surveillance épidémiologique de la listériose en France et en Europe », Hopital Necker-Enfants Malades, 17 janvier 2007, A. Le Monnier
- Conférence « Surveillance épidémiologique de la listériose en France et en Europe », Université de Sassari, Sardaigne(Italie), 9 Février 2007, A. Le Monnier

7 PROGRAMME D'ACTIVITE POUR LES ANNEES 2008-2009

Outre les activités de surveillance de la listériose en routine et la continuité des activités de recherche effectuées en 2007, le programme de travail plus spécifique aux activités d'Expertise du CNRL pour les années 2008-2009 comportera les aspects suivants :

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

- Utilisation de la base de données MLST pour la caractérisation moléculaire des souches isolées lors de différentes épidémies ou de situations cliniques particulières en France et dans le monde, en collection au CNRL;
- évaluation de la technique des puces à ADN par comparaison avec la macrorestriction d'ADN et les autres méthodes de typage ;

Aspects diagnostiques :

- évaluation des performances comparées des différents tests PCR et/ou sérologiques actuellement disponibles dans le diagnostic de listériose ;
- évaluation de la virulence des souches de *Listeria monocytogenes*, et mise en évidence des caractéristiques génotypiques et phénotypiques différenciant les souches cliniques des souches environnementales et notamment alimentaires.

Aspects thérapeutiques :

- étude de la sensibilité aux antibiotiques des souches de *L. monocytogenes* isolées de l'environnement (prédiction des évolutions potentielles sur les souches cliniques), évolution de cette sensibilité au cours du temps et impact clinique des souches tolérantes aux β -lactamines ;
- évaluation de nouvelles alternatives thérapeutiques dans le traitement de la listériose neuroméningée (approches combinées *in vitro* et *in vivo*) ;

Aspects cliniques (en collaboration avec l'InVS) :

- analyse et revue des données clinico-biologiques relatives aux souches d'origine humaine reçues au CNRL ;
- analyse et revue des données clinico-biologiques concernant plus particulièrement les souches à l'origine des formes materno-néonatales ;
- participation à la révision de la fiche de la DO ;
- analyse des cas cliniques ou suspectés à *L. ivanovii*, subsp. *ivanovii*.

CONCLUSION GENERALE

Le CNRL a observé une augmentation de 9% du nombre total de cas de listériose diagnostiqués au cours de l'année 2007 par rapport à 2006 (+9%). Même si cette augmentation confirme la tendance observée en 2006 (+31% par rapport à 2005), elle est cependant moins importante. Toutefois, l'incidence de 4,8 cas par millions d'habitants est la plus élevée depuis 1995. Cette augmentation a essentiellement concerné les formes bactériémiques, alors que le nombre de cas de formes neuro-méningées demeure relativement stable. Par ailleurs, le nombre et la valeur relative des formes materno-néonatales a atteint l'un des niveaux les plus bas depuis 1987. Il semble donc que la population la plus à risque soit constituée principalement des personnes de plus de 60 ans avec ou sans terrain sous-jacent (80% des cas non materno-néonataux). Cette tendance à la recrudescence de la listériose est également observée dans la plupart des pays européens (Goulet et coll., 2008). Elle souligne l'importance de la surveillance microbiologique et épidémiologique de la listériose.

Le CNR des *Listeria* (CNRL), en synergie avec l'InVS, a saisi les différents acteurs de la Santé Publique aux niveaux national, et international (correspondants européens et OMS), afin d'étudier les causes de cette augmentation récente et de proposer des recommandations appropriées, notamment vers les personnes les plus concernées, la population des plus de 60 ans.

En 2007, Swaminathan et Gerner-Smidt du CDC d'Atlanta ont signalé l'efficacité du modèle français de surveillance de la listériose, le comparant à celui des USA (Swaminathan B. and Gerner-Smidt P., 2007). Le CNRL, qui constitue un acteur central de ce système de surveillance, poursuit l'informatisation des processus de surveillance microbiologique et épidémiologique de la listériose au niveau national afin d'accroître sa réactivité face aux situations d'alerte.

Cependant, face à l'accroissement de nos activités d'expertise, les interlocuteurs du CNRL à l'InVS et à la cellule interministérielle de surveillance de la listériose en France ont fait preuve d'exigences croissantes en termes de prestations d'expertise (confirmation systématique par une troisième enzyme des souches de *Listeria*, augmentation des investigations autour des cas groupés, etc.). Les surcoûts engendrés par ces exigences croissantes ne sont pas compatibles avec le budget alloué au CNRL qui a été identique à celui de 2006. Le CNRL a été contraint à solliciter un budget complémentaire en 2007 auprès de l'InVS qu'il a obtenu afin de pouvoir assurer ses missions jusque fin 2007. En 2008, le budget alloué au CNRL reste identique à celui de 2007 sans intégration du budget complémentaire malgré l'augmentation constante du nombre de cas de listérioses en France.

Deux épisodes inédits d'isolements de souches chez l'homme ou de contamination humaine (4 cas + 1 cas suspecté) par *Listeria ivanovii subsp. ivanovii* ont été observés en France au cours de cette année 2007. Par ailleurs, un cas de listériose materno-néonatale a été diagnostiqué par biologie moléculaire sans isolement de *L. monocytogenes*. La définition actuelle de la listériose ne permet pas d'inclure ces cas dans les chiffres officiels du CNRL.

Cette année a également vu la description d'une nouvelle espèce non-virulente de l'environnement en Europe. Le CNRL français a été sollicité pour apporter son expertise à la caractérisation de cette nouvelle espèce pour laquelle le nom de *L. rocourti* a été proposé.

Dans le cadre de ses missions de veille technologique, le CNRL a développé et validé de nouvelles méthodes de typage moléculaire, en collaboration avec la plate forme de génotypage des pathogènes et de Santé Publique. L'isolement récent de souches issues de patients, résistantes à des antibiotiques d'intérêt clinique, a conduit le CNRL à débiter une étude longitudinale sur la résistance aux antibiotiques en collaboration avec le CNR de la résistance aux antibiotiques. Par ailleurs, dans le cadre de nombreuses collaborations scientifiques avec des laboratoires de recherche de l'institut Pasteur ou extérieurs, le

CNRL poursuit ses travaux visant à améliorer le développement d'outils diagnostiques et permettant la caractérisation des souches (détection des principaux facteurs de virulence, étude de la biodiversité et de la structure génétique des populations de *Listeria* et de leur évolution) et de valider de nouvelles alternatives thérapeutiques.

Enfin, la direction du CNRL a été modifiée au 1^{er} janvier 2008: le Professeur Marc Lecuit, infectiologue à l'hôpital Necker-Enfants malades, a été nommé directeur en remplacement du Docteur Alban Le Monnier. Parallèlement, le laboratoire de recherche des *Listeria* a été dissout, et le CNRL a été rattaché au groupe « Microorganismes et barrières de l'hôte » dirigé par Marc Lecuit.

RÉFÉRENCES CITÉES

- Anonyme. Multistate outbreak of listeriosis in the USA, 1998-1999. *Morb. Mort. Week. Rep.* 1998a, 47, 1085-1086.
- Anonyme. Multistate outbreak of listeriosis in the USA, 1998-1999. *Morb. Mort. Week. Rep.* 1998b, 47, 1117-1118.
- Anonyme. Epidémie de listériose à lysovar 2671-108-312. Résultats préliminaires de l'enquête épidémiologique coordonnée par le RNSP. *Bull. Epidémiol. Hebdom.* 1993a, 34, 157-158.
- Anonyme. Epidémie de listériose. *Bull. Epidémiol. Hebdom.* 1993b, 36, 167.
- Anonyme. Recommandations 2007a. Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. SOUSSY C.J. (ed.). SFM, 2007, Paris.
- Anonyme. REMIC: Référentiel en microbiologie médicale (bactériologie et mycologie). SFM, 3^{ème} édition, 2007, Paris
- Aureli P., Fiorucci G.C., Caroli D., Marchiaro G., Novara O., Leone L., Salmaso S. An outbreak of febrile gastroenteritis associated with corn contaminated by *Listeria monocytogenes*. *N. Engl. J. Med.* 2000, 342, 1236-1241.
- Bille J. Listériose en Suisse : les leçons d'une épidémie. In : *Listeria et Sécurité Alimentaire / Listeria and Food Safety*, Proceedings of the International Conference on June 13-14 1991 in Laval, France, ASEPT ed., Laval, 1991, 63-68.
- Bille J., Catimel B., Bannerman E., Jacquet CH., Yersin M.N., Caniaux I., Monget D., Rocourt, J. API *Listeria*, a new and promising one-day system to identify *Listeria* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1992, 58, 1857-1860.
- Bille, J. and Rocourt, J. WHO International multicentre *Listeria monocytogenes* subtyping study - Rationale and set-up of the study. *Int. J. Food Microbiol.* 1996, 32, 251-262.
- Boerlin P., Rocourt J., Piffaretti J.C. Taxonomy of the genus *Listeria* by using multilocus enzyme electrophoresis. *Int. J. System. Bacteriol.*, 1991, 41, 59-64.
- Boogs J.D., Whitman R.E., Hale L.M., Briscoe R.P., Kahn S.E., MacCormack J.N., Maillard J.-M., Grayson S.C., Sigmon K.S., Reardon J.W., Saah J.R. Outbreak of listeriosis associated with homemade Mexican-style cheese-North Carolina, October 2000-January 2001. *Morb. Mort. Week. Rep.*, 2001, 50, 560-562.
- Brosch, R.; Brett, M.; Catimel, B.; Luchansky, J. B.; Ojeniyi, B., and Rocourt, J. Genomic fingerprinting of 80 strains from the WHO multicentre international typing study of *Listeria monocytogenes* via pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). *Int. J. Food Microbiol.* 1996, 32, 343-355.
- Charpentier, E., G. Gerbaud, C. Jacquet, J. Rocourt and P. Courvalin (1995). "Incidence of antibiotic resistance in *Listeria* species." *J Infect Dis* 172(1): 277-81
- Join-Lambert, O. and S. Kayal (2005). "*Listeria*." In: *Antibiogramme*. Courvalin P., Leclercq R., Bingen E. - 2^{ème} édition
- Courtieu A.-L. Rapport du Centre National de Référence de la listériose. *Bull. Epidémiol. Hebdom.*, 1986, 35, 137-138.
- Courtieu A.-L. Rapport du Centre National de Référence des *Listeria* (1984). *Bull. Epidémiol. Hebdom.*, 1985, 47, 6-9.
- Dalton C.B., Med B., Austin C.C., Sobel J., Hayes P.S., Bibb W.F., Graves L.M., Swaminathan B., Proctor M.E. An outbreak of gastroenteritis and fever due to *Listeria monocytogenes* in milk. *New Engl. J. Med.*, 1997, 336, 100-105.
- de Benoist A.C., Goulet V., Laurent E. Infections invasives à *Haemophilus influenzae*, *Listeria monocytogenes*, méningocoque, pneumocoque, streptocoques A et B en France en 1997. *Bull. Epidémiol. Ann.*, 1999, 2, 155-160.
- de Valk H., Vaillant V., Jacquet C., Rocourt J., Le Querrec F., Stainer F., Qulequejeu N., Pierre O., Pierre V.,

- Desenclos J.-C., Goulet V. Two consecutive nationwide outbreaks of listeriosis in France, October 1999-February 2000. *Am. J. Epidemiol.*, 2001, 154, 944-950.
- Doumith M., Jacquet CH., Gerner-Smidt P., Graves L.M., Loncarevic S., Mathisen T., Morvan A., Salcedo C., Torpdahl M., Vazquez J.A., Martin P. Multicenter validation of a multiplex PCR assay for differentiating the major *Listeria monocytogenes* serovars 1/2a, 1/2b, 1/2c, and 4b: toward an international standard. *J. Food Protect.*, 2005, 68, 2648-2650.
- Doumith M., Buchrieser C., Glaser P., Jacquet CH., Martin P. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 2004, 42, 3819-3822.
- Elsner H.-A., Tenschert W., Fisher L., Kaulfers, P.-M. Nosocomial infections by *Listeria monocytogenes* : analysis of a cluster of septicemias in immunocompromised patients. *Infect.*, 1997, 25, 135-139.
- Ericsson H., Eklöw A., Danielsson-Tham D., Loncarevic S., Mentzing L.O., Persson I., Unnerstad H., Tham W. 1997. An outbreak of listeriosis suspected to have been caused by rainbow trout. *J. Clin. Microbiol.*, 1997, 35, 2904-2907.
- Espaze E.P., Rocourt J., Courtieu, A. L. . La listériose en France en 1987 - Etude à partir des souches adressées au Centre National de Référence. *Bull. Epidémiol. Hebdom.*, 1989, 12, 46-47.
- Espaze E.P., Rocourt J., Courtieu, A. L. La listériose en France en 1988 - Etude à partir des souches adressées au Centre National de Référence. *Bull. Epidémiol. Hebdom.*, 1990, 1, 1-2.
- Espaze E.P., Rocourt J., Courtieu A. L. - La listériose en France en 1989 - Etude à partir des souches adressées au Centre National de Référence. *Bull. Epidémiol. Hebdom.*, 1991, 3, 9-10.
- Farber J. M., Pagotto F.J., Daley E., Kopil S., Hughes A., Drew J., Wylie J., Gierke S., Nowicki D., Harlos S., Hammond G., Kettner J. A point-source outbreak of *Listeria monocytogenes* linked to whipping cream. *Proceedings of the XIV International Symposium on Problems of Listeriosis, Mannheim, May 2001*, 171.
- Farber J. M., Peterkin P.I., Carter A.O., Varughese P.V., Ashton F.E., Ewan E. P. Neonatal listeriosis due to cross-infection confirmed by isoenzyme typing and DNA fingerprinting. *J. Infect. Dis.*, 1991a, 163, 927-928.
- Fleming D.W., Cochi S.L., McDonald K.L., Brondum J., Hayes P.S., Plikaytis B.D., Holmes M. B., Audurier A., Broome C.V., Reingold A. L. Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. *New Engl. J. Med.*, 1985, 312, 404-407.
- Frye D.M., Zweig R., Sturgeon J., Tormey M., LeCavalier M., Lee I., Lawani L., MAScola L. An outbreak of febrile gastroenteritis associated with delicatessen meat contaminated with *Listeria monocytogenes*. *Clin. Infect. Dis.*, 2002, 35, 943-949.
- Gerner-Smidt, P.; Boerlin, P.; Ischer, F., and Schmidt, J. High-frequency endonuclease (REA) typing : results from the WHO collaborative study group on subtyping of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.*, 1996, 32, 313-324.
- Swanithan, B., et Gerner-Smidt, P. The epidemiology of human listeriosis. *Microbes and Infection*, 2007, 10, 1236-1243.
- Goulet V. Investigations en cas d'épidémie de listériose. *Méd. Mal. Infect.*, 1995a, 25, 184-190.
- Goulet V., Brohier S. La listériose en France en 1986 - Recensement auprès de laboratoires hospitaliers. *Sem. Hop. Paris.*, 1989, 65, 2509-2514.
- Goulet V., Jacquet CH., Vaillant V., Rebiere I., Mouret E., Lorente C., Maillot E., Stainer F., Rocourt J. Listeriosis from consumption of raw-milk cheese. *Lancet*, 1995b, 345, 1581-1582.
- Goulet V., Léonard J.-L., Celers J. Etude épidémiologique de la listériose humaine en France en 1984. *Rev. Epidémiol. Santé Publ.*, 1986, 34, 191-195.
- Goulet V., Léonard J.-L., Celers J.. Etude épidémiologique de la listériose humaine en France en 1984. *Bull. Epidémiol. Hebdom.*, 1987, 8, 29-31.

- Goulet V., Lepoutre A., Rocourt J., Courtieu A.L., Dehaumont P., Veit P. Epidémie de listériose en France - Bilan final et résultats de l'enquête épidémiologique. Bull. Epidémiol. Hebdom., 1993, 4, 13-14.
- Goulet V., Mamet J.-P., Magny F., Rebière I., Espaze E. P. La listériose en France en 1988 - Etude rétrospective à partir d'un échantillon d'hôpitaux publics. Bull. Epidémiol. Hebdom., 1990, 33, 141-142.
- Goulet V., de Valk H., Pierre O., Stainer F., Rocourt J., Vaillant V., Jacquet CH., Desenclos J.C. Important reduction in the incidence of human listeriosis, in a context of preventive efforts in France. Emerg Infect. Dis., 2001, 7, 983-989.
- Goulet V., Jacquet Ch., Laurent E., Rocourt J., Vaillant V., de Valk H. La surveillance de la listériose humaine en France en 1999. Bull. Epidémiol. Hebdom., 2001, 34, 161-165.
- Goulet V., Martin P., Jacquet CH. Cluster of listeriosis cases in France. Eurosurveillance Weekly, 2002, 27, 5-6.
- Goulet V., Jacquet Ch., Martin P., Vaillant V., Laurent E., de Valk H. Surveillance de la listériose en France, 2001. Bull. Epidémiol. Hebdom., 2004, 9, 33-34.
- Goulet V., Jacquet CH., Laurent E.. Surveillance de la listériose humaine en France de 2001 à 2003. Surveillance nationale des maladies infectieuses, 2005, <http://www.invs.sante.fr/publications/2005/snmi/listeriose.html>.
- Goulet V., Rocourt J., Rebiere I., Jacquet CH., Moyse C., Dehaumont P., Salvat G., Veit P. Listeriosis outbreak associated with the consumption of rillettes in France in 1993. J. Infect. Dis., 1998, 177, 155-160.
- Goulet, V., C. Jacquet, P. Martin, V. Vaillant, E. Laurent and H. de Valk. "Surveillance of human listeriosis in France, 2001-2003." Euro Surveill, 2006, 11(6): 79-81.
- Goulet, V., Hedberg C., Le Monnier A., et H. de Valk. Listeriosis in France in a context of increasing incidence in European countries. Emerging infectious Disease (Article sous presse).
- Graves L., Hunter S., Tucker N., Brett M., Harvey J., Jacquet CH., Kerouanton-Legall A., Lehnkering E., Ojeniyi B., Wagner M., Brisabois A., Gilmour A., Rocourt J., Swaminathan B. Status report on WHO-sponsored international collaborative study of subtyping methods for *Listeria monocytogenes* : pulsed-field gel electrophoresis, phase III. Proceedings of the XIV International Symposium on Problems of Listeriosis, Mannheim, 13-16 mai 2001, 149.
- Graves L.M., et B. Swaminathan. PulseNet standardized protocol for subtyping *Listeria monocytogenes* by macrorestriction and pulsed-field gel electrophoresis. Int. J. Food Microbiol., 2001, 65, 55-62.
- Howard P.J., Harsono K.D., et J.B. Luchansky. Differentiation of *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Listeria ivanovii*, and *Listeria seeligeri* by Pulsed-Field gel electrophoresis. Appl. Env. Microbiol., 1992, 58, 709-712.
- Jacquet CH., Aubert S., El Sohl N., Rocourt J. Use of rRNA gene restriction patterns for the identification of *Listeria* species. System. Appl. Microbiol., 1992a, 15, 42-46.
- Jacquet Ch., Bille J., Rocourt J. Typing of *Listeria monocytogenes* by restriction polymorphism of the ribosomal ribonucleic acid gene region. Zbl. Bakt., 1992b, 276, 356-365.
- Jacquet Ch., Catimel B., Brosch R., Buchrieser C., Dehaumont P., Goulet V., Lepoutre A., Veit P., Rocourt J. Investigations related to the epidemic strain involved in the French listeriosis outbreak in 1992. Appl. Environ. Microbiol., 1995a, 61, 2242-2246.
- Jacquet Ch., Saint-Clément C., Brouillé F., Catimel B., Rocourt J. La listériose humaine en France en 1997. Données du Centre National de Référence des *Listeria*. Bull. Epidémiol. Hebdom., 1998, 33, 142-143.
- Jacquet Ch., Michelon F., Saint-Clément C., Rocourt J. La listériose humaine en France en 1994. Données du Centre National de Référence. Bull. Epidémiol. Hebdom., 1995b, 39, 173-174.
- Jacquet Ch., Miegerville A.-F., Catimel B., Huynh G., Courtieu A.L., Rocourt J. La listériose humaine en France en 1991, 1992 et 1993 - Bilan à partir de souches adressées aux centres nationaux de référence. Bull. Epidémiol. Hebdom., 1994, 28, 123-125.
- Jacquet Ch., Rocourt J. La listériose humaine en France en 1999 - Données du Centre National de Référence. Feuille. Biol., 2001, XXXXII, 19-21.

Jacquet Ch., Martin P.M.V., Rocourt J. Listériose humaine en France en 2000 – Données du Centre National de Référence des *Listeria*. Feuille. Biol., 2002, XXXXIII, 84-86.

Jean D., Croize J., Hirtz P., Legeais C., Pelloux I., Favier M., Malaret M.R., Noc P., Rambaud P. Infection nosocomiale à *Listeria monocytogenes* en maternité. Arch. Franç. Pédiat., 1991, 48, 419-422.

Lamoril J., Bogard M., Ameziane N., Deybach J.-C., Bouizegaerène P. Biologie moléculaire et microbiologie clinique en 2007: Les applications et leur avenir Partie 2. Immuno-analyse et biologie spécialisée, 2007, 22, 73-94.

Lehmann S., Schönberg A. Report of the phase III of the WHO serotyping study of *Listeria monocytogenes*. Proceedings of the XIV International Symposium on Problems of Listeriosis, Mannheim, 13-16 mai 2001, 149.

Lemagny F., Rebière I., Rocourt J., Hubert B. Listériose humaine : enquête épidémiologique de deux épisodes épidémiques en France, en 1988 et 1989. Bull. Epidémiol. Hebdom., 1989, 39, 162-163.

Lindstedt B.A., Tham W., Danielsson-Tham M.L., Vardund T., Helmersson S., Kapperud G. Multiple-locus variable-number tandem-repeats analysis of *Listeria monocytogenes* using multicolour capillary electrophoresis and comparison with pulsed-field gel electrophoresis typing. J. Microbiol. Methods, 2008, 72(2), 141-148.

Linnan M.J., MAscola, L., Lou X.D., Goulet V., May S., Salminen C., Hird D.W., Yonekura M.L., Hayes P., Weaver R., Audurier A., Plikaytis B.D., Fannin S.L., Kleks A., Broome C.V. Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese. New Engl. J. Med., 1988, 319, 823-828.

Lyytikäinen O., Autio T., Maijala R., Ruutu P., Honkanene-Buzalski T., Miettinen M., Hatakka M., Mikkola J., Anttila V.J., Johansson, T., Rantala L., Aalto T., Korkeala H., Siitonen A. An outbreak of *Listeria monocytogenes* serotype 3a infections from butter in Finland. J. Infect. Dis., 2000, 181, 1838-1841.

Martin P., Jacquet CH., Goulet V. La surveillance de la listériose en France. Bulletin de l'Association des Anciens Elèves de l'Institut Pasteur, 2003, 45, 131-139.

McLauchlin J., Audurier A., Frommelt A., Gerner-Smidt P., Jacquet C., Loessner M. J., van der Mee-Marquet N., Rocourt J., Shah S., Wilhelms D. WHO study on subtyping *Listeria monocytogenes*: results of phage-typing. Int. J. Food Microbiol., 1996, 3, 289-300.

McLauchlin J., Hall S.M., Velani S.K., Gilbert R.J. Human listeriosis and paté - A possible association. Brit. Med. J., 1991, 303, 773-775.

McLauchlin J., Hoffman P.N. Neonatal cross-infection from *Listeria monocytogenes*. Comm. Dis. Rep., 1989, 16, 3-4.

Miettinen M.K., Siitonen A., Heiskanen P., Haajanene H., Björkroth K.J., Korkeala H.J. Molecular epidemiology of an outbreak of febrile gastroenteritis caused by *Listeria monocytogenes* in cold-smoked rainbow trout. J. Clin. Microbiol., 1999, 37, 2358-2360.

Murphy M., Corcoran D., Buckley J.F., O'Mahony M., Whyte P., Fanning S. Development and application of Multiple-Locus Variable number of tandem repeat analysis (MLVA) to subtype a collection of *Listeria monocytogenes*. Int. J. Food Microbiol., 2007, 115(2), 187-194.

Ooi, S. T. and B. Lorber (2005). "Gastroenteritis due to *Listeria monocytogenes*." Clin Infect Dis 40(9): 1327-3

Pejaver R.K., Watson A.H., Mucklow E.S. Neonatal cross-infection with *Listeria monocytogenes*. J. Infect., 1993, 26, 301-303.

Proctor M.E., Brosch R., Mellen J.W., Garrett L.A., Kaspar C.W., Luchansky J.B. Use of pulsed-field gel electrophoresis to link sporadic cases of invasive listeriosis with recalled chocolate milk. Appl. Environ. Microbiol., 1995, 61, 3177-3179.

Ramage C.P., Low J.C., McLauchlin J., and W. Donachie. Characterisation of *Listeria ivanovii* isolates from the UK using pulsed-field gel electrophoresis. FEMS Microbiol. Lett., 1999, 170, 349-353.

Richard S., Oggioni C., Jacquet Ch., Laurent E., Lequerrec F., Quelquejeu N., Goulet V. Investigations autour de cas de listériose neuroméningée : bilan de 17 mois de fonctionnement (août 2001-décembre 2002). Bull. Epidémiol.

Hebdom., 2004, 9, 35-36.

Roberts R.J., Quoraiishi A.H., Evans M.R. Neonatal listeriosis in twins due to cross-infection in theatre recovery room. *Lancet*, 1994, 344, 1572.

Rocourt J., Boerlin P., Grimont F., Jacquet CH., Piffaretti J.-C. Assignment of *Listeria grayi* and *Listeria murrayi* to a single species, *Listeria grayi*, with a revised description of *Listeria grayi*. *Int. J. System. Bacteriol.*, 1992, 42, 69-73.

Rocourt J., Espaze E.P., Minck R., Catimel B., Hubert B., Courtieu A.L. Cluster of listeriosis isolates with different serovar and phagovar characteristics. *Lancet*, 1989, 334, 1217-1218.

Rocourt J., Grimont F., Grimont P.A.D., Seeliger H.P.R. DNA relatedness among serovars of *Listeria monocytogenes sensu lato*. *Curr. Microbiol.*, 1982, 7, 383-388.

Rocourt J., Grimont P.A.D. *Listeria welshimeri* sp. nov. and *Listeria seeligeri* sp. nov. *Int. J. System. Bacteriol.*, 1983a, 33, 866-869.

Rocourt J., Schrettenbrunner A., Seeliger H.P.R. Différenciation biochimique des groupes génomiques de *Listeria monocytogenes* (sensu lato). *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*, 1983b, 134A, 65-71.

Rocourt J., Seeliger H.P. La listériose : une infection hospitalière ? *Méd. Mal. Infect.*, 1985, 15, 721-725.

Rocourt J., Jacquet Ch., Brouillé F., Saint Cloment C., Catimel B. La listériose humaine en France en 1995 et 1996 – Données du Centre National de Référence des *Listeria*. *Bull. Epidémiol. Hebdom.*, 1997, 41, 186-187.

Rocourt J., Espaze E.P., Miegerville A.F., Catimel B., Courtieu, A.L. La listériose en France en 1990 – Etude à partir des souches adressées au Centre National de Référence. *Bull. Epidémiol. Hebdom.*, 1992b, 16, 69-70.

Salamina G., Dalle Donne E., Niccolini A., Poda G., Cesaroni D., Bucci M., Fini R., Maldini, M., Schuchat A., Swaminathan B., Bibb W., Rocourt, J., Binkin N., Salmaso S. A foodborne outbreak of gastroenteritis involving *Listeria monocytogenes*. *Epidemiol. Infect.*, 1996, 117, 429-436.

Schlecht W.F., Lavigne P.M., Bortolussi R.A., Allen A.C., Haldane E.V., Worth A.J., Hightower W., Johnson S.E., King S.H., Nicolls E.S., Broome C.V. Epidemic listeriosis - Evidence for transmission by food. *New Engl. J. Med.*, 1983, 308, 203-206.

Schönberg, A.; Bannerman, E.; Courtieu, A. L.; Kiss, R.; McLauchlin, J.; Shah, S., and Wilhelms, D. Serotyping of 80 strains from the WHO multicentre international typing study of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.*, 1996, 32, 279-287.

Schuchat A., Lizano C., Broome C.V., Swaminathan B., Kim C., Winn K. Outbreak of neonatal listeriosis associated with mineral oil. *Pediat. Infect. Dis. J.*, 1991, 10, 183-189.

Schwartz B., Hexter D., Broome C.V., Hightower A.W., Hirschhorn R.B., Porter J.D., Hayes P.S., Bibb W.F., Lorber B., Faris D. G. Investigation of an outbreak of listeriosis : new hypotheses for the etiology of epidemic *Listeria monocytogenes* infections. *J. Infect. Dis.*, 1989, 159, 680-685.

Seeliger H.P.R., Höhne K. Serotyping of *Listeria monocytogenes* and related species. In : *Methods in Microbiology*, Bergan, T. and Norris, J., ed., 1979; Academic Press, New York, 33-48.

Seeliger H.P.R., Rocourt J., Schrettenbrunner A., Grimont P.A.D., Jones D. *Listeria ivanovii* sp. nov. *Int. J. System. Bacteriol.*, 1984, 34, 336-337.

Sethi S.K., Ghafoor M.A., Vandepitte J. Outbreak of neonatal listeriosis in a regional hospital in Kuwait. *Eur. J. Pediat.*, 1989, 148, 368-70.

Sperry K.E., Kathariou S., Edwards J.S., Wolf L.A. Multile-Locus Number Tandem Repeat Analysis as a subtyping tool for *Listeria monocytogenes*. *J. Clin. Microbiol.* (Sous presse)

Stamm A.M., Dismukes W.E., Simmons B.P., Cobbs C.G., Elliott A., Budrich P., Harmon J. Listeriosis in renal transplant recipients : report of an outbreak and review of 102 cases. *Rev. Infect. Dis.*, 1982, 4, 665-682.

Swaminathan, B.; Hunter, S. B.; DeSmarchelier, P. M.; Gerner-Smidt, P.; Graves, L. M.; Harlander, S.; Hubner, R.; Jacquet, Ch.; Pedersen, B.; Reineccius, K.; Ridley, A.; Saunders, N. A., and Webster, J. A. WHO-sponsored

international collaborative study to evaluate methods for subtyping *Listeria monocytogenes*: restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis using ribotyping and Southern hybridization with two probes derived from *L. monocytogenes* chromosome. Int. J. Food Microbiol., 1996, 32, 263-278.

Veit P. Investigations des administrations de contrôle pour rechercher l'origine alimentaire de deux épidémies de listériose survenues en France en 1992 et 1993. Méd. Mal. Infect., 1995, 25, 191-193.

Wernars, K.; Boerlin, P.; Audurier, A.; Russell, E. G.; Curtis, G. D. W.; Herman, L., and van der Mee-Marquet, N. The WHO multicentre study on *Listeria monocytogenes* subtyping: random amplification of polymorphic DNA (RAPD). Int. J. Food Microbiol., 1996, 32, 325-341.