

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



ANNEE 2008

RESPONSABLE : M. LECUIT

RESPONSABLE ADJOINT : A. LECLERCQ

SECRETAIRE : M. BELIN

COLLABORATEURS : V. CHENAL-FRANCISQUE (*depuis le 01/02/08*)
V. CADET-DANIEL (*jusqu'au 31/10/08*)
T. CANTINELLI (*depuis le 01/11/08*)
H. DIEYE
A. MORVAN

DATE : Mars 2009

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 (M. Lecuit and A. Leclercq. 2008. Rapport annuel d'activité du Centre national de Référence des Listeria – Année 2008. Institut Pasteur, Paris, France.) dont elles sont issues.

Avant-propos

Le Centre National de Référence des *Listeria* remercie vivement l'ensemble de ses correspondants et partenaires pour l'envoi en 2008 de souches et de renseignements permettant de remplir sa mission de surveillance microbiologique de la listériose en France et d'établir ce rapport.

TABLE DES MATIERES

RESUME DE L'ANNEE 2008.....	8
1 INTRODUCTION.....	9
1.1 Personnel permanent.....	12
1.1.1 Organigramme general	12
1.2 Locaux.....	13
1.3 Equipement	13
1.4 Mise en place de la démarche de management de la Qualité au sein du CNRL.....	14
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 et marqueurs épidémiologiques disponibles.....	15
2.1.1.2 Techniques développées en 2008.....	17
2.1.1.3 Méthodes en développement	18
2.1.1.4 Méthodes en cours de validation.....	19
2.1.1.4.1 Evaluation des kits de sérodiagnostic et de PCR.....	19
2.1.1.4.1.1 Projet MONALISA : Multicentric Observational National Analysis of LISteriosis and <i>listeria</i> 20	
2.1.1.4.2 Evaluation du milieu ALOA-Confirmation™.....	20
2.1.1.4.3 Evaluation des <i>L. monocytogenes</i> 4ab.....	21
2.1.2 Maintien, détention et diffusion de matériel biologique	21
2.1.2.1 Les souches bactériennes	21
2.1.2.2 Les Serums.....	24
2.1.2.3 Les bactériophages.....	24
2.1.2.4 Diffusion et échange de matériel biologique	24
2.1.2.5 Conditions de mise à disposition de ces collections	25

2.1.3	Techniques recommandées par le CNRL	25
2.1.3.1	Recommandations générales.....	25
2.1.3.1.1	En microbiologie clinique.....	25
2.1.3.1.2	En microbiologie vétérinaire.....	27
2.1.3.1.3	En microbiologie des aliments.....	27
2.1.4	Travaux d'évaluation et d'amélioration des techniques, réactifs et troussees	31
2.1.5	Gestion, protection et sauvegarde de la base de données du CNRL.....	31
2.2	Surveillance de la listériose humaine en France.....	32
2.2.1	Surveillance microbiologique de la listériose en France.....	32
2.2.2	Surveillance et signalement.....	34
2.2.3	Phase de surveillance renforcée.....	35
2.2.4	Phase d'Alerte	35
2.2.5	Surveillance de la résistance aux antibiotiques	36
2.2.6	Détection et analyse des infections nosocomiales	37
2.3	Contribution aux réseaux de surveillance europeens et internationaux.....	38
2.3.1	Laboratoire Communautaire de Référence des <i>Listeria monocytogenes</i>	38
2.3.2	European Center for Diseases Control: ECDC.....	39
2.3.3	Centre Collaborateur OMS pour la listériose d'origine alimentaire (CCOMS).....	39
2.3.4	PulseNet Europe.....	40
2.3.5	EC Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF).....	41
3	ACTIVITES DE SURVEILLANCE	42
3.1	Données de la surveillance microbiologique de la listériose humaine	42
3.1.1	Cas de listériose en France.....	42
3.1.1.1	Définition de cas	42
3.1.2	Analyse globale des cas de listeriose.....	43
3.1.3	Cas de listériose en France métropolitaine	46
3.1.3.1	Distribution temporelle des cas.....	47
3.1.3.2	Distribution géographique des cas.....	50
3.1.3.3	Distribution des cas selon la forme clinique.....	51

3.1.3.4	Distribution des souches selon le groupe PCR.....	59
3.1.4	Cas de listériose dans les DOM-TOM.....	64
3.1.5	Etude de la résistance aux antibiotiques.....	65
3.1.6	Typage moléculaire des souches par macrorestriction d'ADN.....	66
3.2	Caractérisation des souches d'origine non humaine.....	67
3.2.1	Analyse générale.....	67
3.2.2	Souches isolées d'aliments.....	70
3.2.2.1	Catégories de laboratoires ayant adressé les souches.....	70
3.2.2.2	Nombre de souches et distribution par espèce.....	72
3.2.2.3	Distribution des souches de <i>L. monocytogenes</i> par catégorie d'aliments.....	72
3.2.2.4	Distribution des souches de <i>L. monocytogenes</i> par groupe PCR.....	72
3.2.3	Souches isolées de l'environnement.....	73
3.3	Bilan des investigations, signalements et alertes.....	75
3.3.1	Suspensions d'infections nosocomiales.....	75
3.3.2	Signalements.....	75
3.3.3	Alertes DGAI.....	76
3.3.4	Alerte DGCCRF.....	77
3.3.5	Alerte Européenne.....	77
3.3.6	Alerte Canadienne.....	77
3.3.7	Enquête des formes neuroméningées.....	78
3.4	Conclusion.....	78
4	ACTIVITES D'INFORMATION, DE FORMATION ET DE CONSEIL.....	80
4.1	Centre de documentation.....	80
4.2	Diffusion de l'information sur <i>Listeria</i> et la listériose.....	80
4.2.1	Site Internet.....	81
4.2.2	Cours et conférences sur invitation.....	81
4.2.3	Formation et encadrement.....	81
4.2.4	Journées portes ouvertes.....	82

4.2.5	Demande d'informations et de conseils.....	83
4.3	Expertise	84
4.4	Retour d'informations	85
5	TRAVAUX DE RECHERCHE EN LIEN DIRECT AVEC L'ACTIVITE DU CNR	87
5.1	Contributions aux etudes epidemiologiques	87
5.1.1	Evaluation des critères d'investigation des cas groupés	87
5.1.2	Augmentation du nombre de cas français de listérioses	88
5.1.3	Etude des formes materno-foetales depuis 1987	89
5.2	Méthodes de diagnostic et atypies des souches	89
5.2.1	Profil atypique de séro groupe PCR de <i>L. monocytogenes</i>	89
5.2.2	Absence de catalase de souches de <i>L. monocytogenes</i>	90
5.2.3	Profils de macrorestriction d'ADN différents pour des souches provenant du même patient.....	90
5.3	Etude de la virulence	90
5.3.1	Infection à <i>L. ivanovii</i> subsp. <i>ivanovii</i>	90
5.3.2	Etude de la traversée de la barrière placentaire par <i>L. monocytogenes</i>	91
5.4	Développement de nouveaux tests diagnostiques	92
5.4.1	Macrorestriction d'ADN de <i>L. monocytogenes</i> par PFGE avec l'enzyme de restriction <i>SmaI</i>	92
5.5	Développement de nouveaux outils de typage moléculaire et etude de la diversité des <i>Listeria</i>	93
5.5.1	Analyse de la structure des populations de <i>L. monocytogenes</i> sur un échantillonnage mondial par Multilocus Sequence Typing of <i>Listeria</i>	93
5.5.2	La diversité environnementale des <i>Listeria</i>	94
5.6	Etude de la résistance aux antibiotiques	94
5.7	Validation de nouvelles thérapeutiques	95
5.7.1	La Moxifloxacin	95
5.8	Projets collaboratifs.....	96
5.9	Conclusion	97
6	LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS	98
6.1	Publications nationales	98
6.2	Publications internationales	98
6.3	Communications nationales	99

6.4	Communications internationales	99
6.5	Conférences sur invitations.....	100
6.6	Interviews Télévisées ou radios.....	100
6.7	Articles de presse nationale.....	100
7	PROGRAMME D'ACTIVITE POUR LES ANNEES 2008-2009	101
8	CONCLUSION GENERALE	102
	Références citées.....	103

RESUME DE L'ANNEE 2008

Le CNRL, en lien avec l'InVS, a observé en 2008, 272 cas de listériose, correspondant à une incidence de 4,3 cas/million d'habitants, comparable à l'année 2006, et en légère diminution par rapport à l'année 2007 (299 cas, incidence de 5 cas/million d'habitants). Cette incidence reste élevée par rapport aux années 2001-2005. Il est difficile de conclure à ce stade si l'année 2008 illustre l'amorce d'une ré-inversion de tendance, ou si l'on assiste à une variation interannuelle non significative, dans un contexte général national et européen à la hausse depuis 2005 (Goulet et coll., 2008). Ceci souligne l'importance de ne pas alléger la surveillance microbiologique et épidémiologique de la listériose, surtout au regard des épidémies canadiennes, qui sont survenues dans un pays où ce pathogène semblait être maîtrisé. Une diminution des formes bactériémiques jusqu'alors en augmentation et une augmentation des formes neuroméningées ont été relevées. Par ailleurs, le nombre et la valeur relative des formes materno-néonatales a atteint l'un des niveaux les plus bas depuis 1987. La population la plus à risque semble donc être constituée principalement des personnes de plus de 60 ans avec ou sans terrain sous-jacent (77 % des cas non materno-néonataux).

Le CNR des *Listeria* (CNRL), en lien avec l'InVS, a fait part de l'augmentation des cas constatée depuis 2005 dans des publications scientifiques ainsi que destinées au grand public. Les acteurs de la Santé Publique aux niveaux national et international (correspondants européens et OMS) étudient actuellement les causes de cette augmentation récente afin de proposer des recommandations appropriées.

Le CNRL, qui constitue un acteur central du système de surveillance français, 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.

Dans le cadre de ses missions de veille technologique, le CNRL a développé et validé de nouvelles méthodes de typage moléculaire, telles que la MLST, en collaboration avec la plateforme de génotypage des pathogènes et de Santé Publique. Une étude longitudinale en collaboration avec le CNR de la résistance aux antibiotiques a montré que les souches cliniques de *L. monocytogenes* étaient en majorité sensibles aux antibiotiques utilisés dans les traitements de référence, ce qui n'écarte pas l'intérêt du développement de traitements alternatifs, notamment dans un contexte d'allergie aux β -lactamines, dans un souci d'une meilleure efficacité, ou dans le contexte d'une possible émergence de résistance. Par ailleurs, dans le cadre de collaborations scientifiques au sein de l'Institut Pasteur et extérieurs, le CNRL poursuit ses travaux visant à améliorer le diagnostic et 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), à mieux comprendre la physiopathologie de la listériose humaine et à valider de nouvelles approches thérapeutiques.

1 INTRODUCTION

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

- l'existence d'une population 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 des formes invasives : infection du système nerveux central, septicémie chez le nouveau-né et l'adulte, avortement ; des cas de gastro-entérites fébriles à *L. monocytogenes* ont également été 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 (20 à 30 %) pour les formes invasives ; des séquelles fréquentes ;
- mais une incidence faible pour les formes invasives : 2 à 7 cas par million d'habitants ;
- enfin une prévalence qui diffère entre pays industrialisés et pays en développement où elle n'est que rarement rapportée, du fait du manque de moyens diagnostiques et de système de surveillance, et de la prévalence élevée de nombreuses autres pathologies infectieuses. Cependant, un certain nombre d'autres facteurs peuvent expliquer cette apparente disparité géographique : modes de production et de consommation des aliments (production industrielle, utilisation de la chaîne du froid, développement des aliments consommés en l'état) et démographiques (accroissement du nombre de personnes âgées et augmentation du nombre de sujets immunodéprimés 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 ou comme en 2008 au Canada (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. 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 un recensement des cas.

La Direction Générale de la Santé (DGS) s'est munie depuis 1982 d'un tel système de surveillance [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)], 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, le Centre National de Référence des *Listeria* a été hébergé par le Laboratoire des *Listeria* puis le Groupe à cinq ans « Microorganismes et barrières de l'hôte » de l'Institut Pasteur. Il assure 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 spécifiques du CNRL sont les suivantes :

- Typer en routine par une méthode discriminante basée sur le génotypage les souches humaines qui lui sont adressées et mettre en œuvre une nomenclature des souches fondée 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.

Outre ces missions, le CNRL en 2008 a intensifié ses relations avec le Laboratoire National de Référence des *Listeria monocytogenes* (LNRI, AFSSA-LERQAP) afin de recueillir ses données et informations complémentaires pour la surveillance nationale de la listériose en France.

Les données du 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). À ces publications s'ajoutent les 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 les données de la Déclaration Obligatoire (Goulet et coll., 2001, 2004, 2005 et 2006). L'évolution de la listériose en France est similaire à celle 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).

L'incidence de la listériose en France a diminué notablement de 1987 à 2001, puis s'est stabilisée ensuite jusqu'en 2005 autour de 3,5 cas/million d'habitants. En 2006 a été constaté un inversement de cette tendance avec une réaugmentation brusque de l'incidence à 4,6 cas/million d'habitants qui s'est prolongée en 2007 pour atteindre 5,0 cas/million d'habitants. Le bilan de l'année 2008 fait état d'une incidence de 4,3 cas/million d'habitants, un chiffre proche de celui de l'année 2006 (Goulet et coll., 2008). Les résultats des années à venir permettront de déterminer si l'augmentation du nombre de cas observée en 2006 et 2007 s'inscrivait dans une tendance de fond, ou n'étaient que des épiphénomènes. L'observation dans d'autres pays d'Europe d'une augmentation comparable est plutôt en faveur d'une réelle évolution épidémiologique.

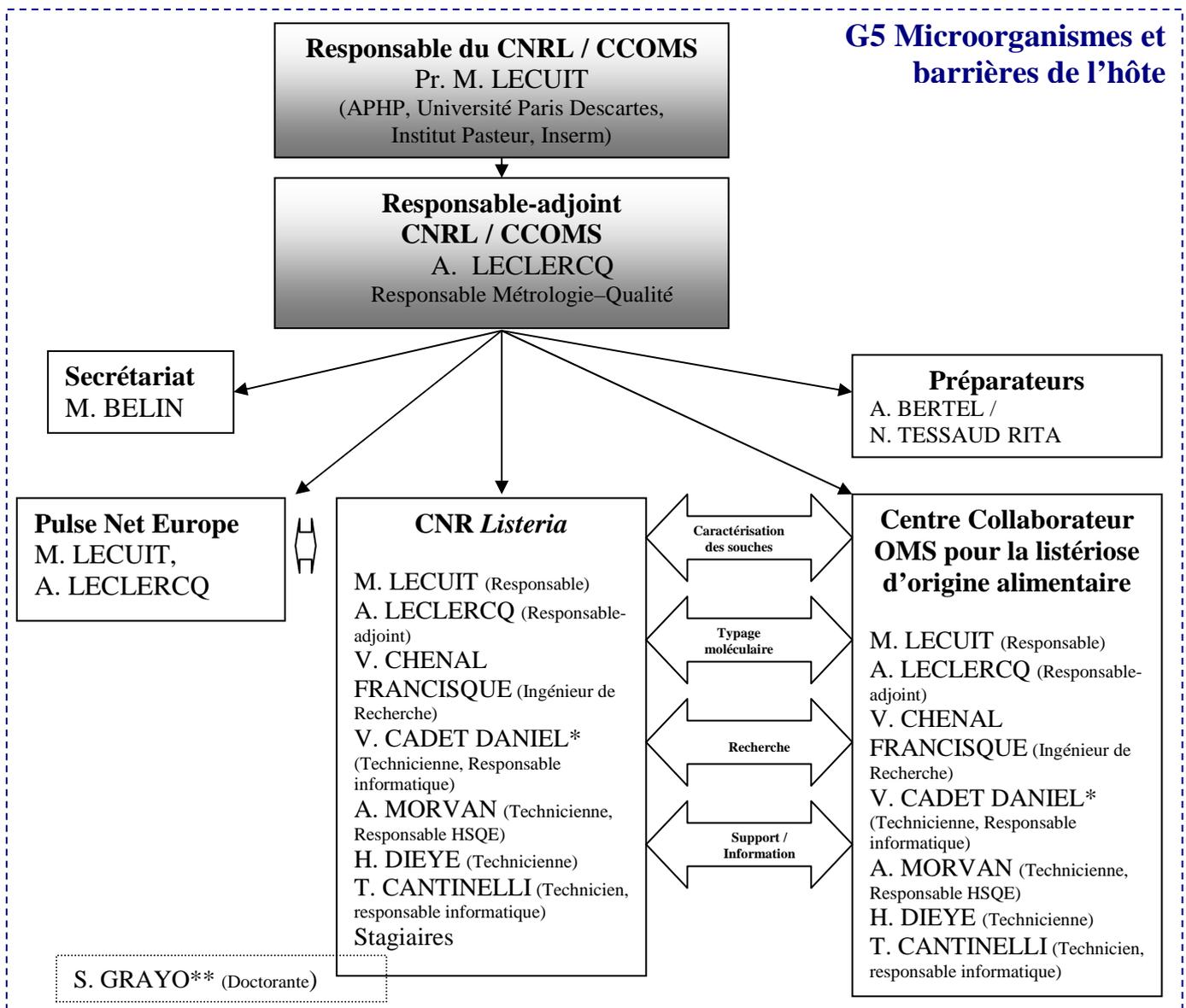
Le laboratoire héberge le CNRL étant également désigné Centre Collaborateur de l'OMS, il peut également participer à la surveillance de cette infection dans les pays qui en font la demande.

1.1 PERSONNEL PERMANENT

1.1.1 ORGANIGRAMME GENERAL

Le Groupe à cinq ans (G5) « Microorganismes et Barrières de l'hôte » héberge le Centre National de Référence des *Listeria* (CNRL) en charge de la surveillance microbiologique et épidémiologique de la listériose en France, et le Centre Collaborateur OMS de la listériose d'origine alimentaire (CCOMS).

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



* personnel ayant quitté le CNRL en 2008

** financement Fondation pour la Recherche Médicale

1.2 LOCAUX

Laboratoires et bureaux:

Le CNR des *Listeria* (CNRL) est hébergé à l'Institut Pasteur en 2008 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 de l'Ingénieur de recherche du CNRL/CCOMS, 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 Responsable-adjoint du CNRL/CCOMS,

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 conservation des souches en congélateur à -80°C,

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

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 EQUIPEMENT

L'ensemble des équipements scientifiques font l'objet d'une maintenance et d'un suivi métrologique (Etalonnage-Cartographie et/ou vérification).

L'ensemble des équipements informatiques est en location et gérés par la société PCO en contrat avec l'Institut Pasteur. Cette société est soumise à un contrat de confidentialité et de respect des exigences CNIL pour les données de santé publique et celles des correspondants du laboratoire.

Moyens extérieurs à la structure / Structures Transversales

- Plate-forme Génomique (PF1)
- Plate-forme Puces à ADN (PF2)
- Plate-forme de Génotypage des Pathogènes et Santé Publique (PF8)
- Animalerie des agents pathogènes.

1.4 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 un objectif prioritaire de la Direction de l'Institut Pasteur. La Direction déléguée « Direction déléguée à l'hygiène, la sécurité, la qualité, l'environnement et au développement durable (HSQEDV) » de l'Institut Pasteur coordonne cette action et affecte un ingénieur qualité pour l'ensemble des CNRs. 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. 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.

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.

Depuis 2007, le recrutement d'un nouveau responsable adjoint au CNR des *Listeria* en charge du Management de la Qualité a abouti à la révision progressive de l'ensemble des documents qualité et à la création progressive d'un manuel qualité en relation avec le manuel qualité de l'Institut Pasteur dans le but du passage à l'évaluation par le COFRAC selon le référentiel NF EN ISO CEI 17025.

→ Les lignes d'essais, cœur de l'activité technique du CNRL, qui seront soumises à ce projet d'accréditation du CNRL 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)

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 participe à la surveillance épidémiologique de la listériose d'origine humaine en France. Le CNRL 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 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 produits de la Direction Générale de l'Alimentation (DGAI) 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. Si la souche envoyée est un mélange de souches, elle est isolée sur gélose sélective chromogène ALOA[®] (AES Laboratoire, France).
- **Confirmation de l'identification au genre et à l'espèce** par des tests biochimiques [galerie API-*Listeria*[®] (bioMérieux, France)] et recherche de l'hémolyse selon des méthodes précédemment publiées (Bille et coll., 1992 ; Rocourt et coll., 1983b), complétés par d'autres tests classiques si nécessaire. Les souches atypiques font l'objet d'investigations complémentaires appropriées, en fonction de l'expérience phénotypique et moléculaire

acquise par anciennement le Laboratoire des *Listeria* dans la taxonomie de ce genre bactérien (Boerlin et coll., 1991 ; Jacquet et coll., 1992a et b ; Rocourt et coll., 1982, 1983a et 1992 ; Seeliger et coll., 1984). 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 permet d'identifier de nouvelles espèces de *Listeria*, comme *L. rocourti* en 2008, et d'identifier des profils atypiques en séro groupe PCR. Toutes les souches non *Listeria* présentant quelques caractéristiques phénotypiques du genre sont expertisées par cette méthode.

- **Détermination du séro groupe 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). Cette « PCR multiplex » possède pour cible une partie de la séquence du gène *prs* présent dans l'ensemble des espèces décrites de *Listeria* et quatre séquences d'autres gènes (*lmo1118*, *lmo0737*, *ORF2110*, *ORF2819*) spécifiques de *L. monocytogenes* permettant de déterminer « le séro groupe PCR ». D'après les résultats du CNRL depuis 2005, cette PCR multiplex peut remplacer directement l'identification phénotypique des *L. monocytogenes* en identifiant son « séro groupe PCR ». Dans le cadre d'urgence sanitaire concernant des cas de listérioses, le CNRL effectue cette PCR multiplex directement sur la culture sur gélose nutritive de la souche envoyée par le correspondant. Il en est de même quand le CNRL a constaté la réception d'une souche identifiée comme n'appartenant pas au genre *Listeria*. La PCR multiplex est alors directement effectuée sur les colonies confluentes de la culture sur gélose nutritive de la souche réceptionnée afin de s'assurer de l'absence de la présence de *Listeria*, d'un séro groupe inconnu de *L. monocytogenes*, d'une nouvelle espèce de *Listeria* ou de *L. monocytogenes* en faible nombre.
- **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). Dans certains cas, une troisième enzyme *SmaI* peut être utilisée selon la méthode interne développée par le CNRL afin d'augmenter le pouvoir discriminant de la PFGE. Ce 3^{ème} enzyme sert : (i) à différencier des profils avec les enzymes *AscI/ApaI* très proches (1 ou 2 bandes de différences) pour leur attribuer un numéro correct de nomenclature et les relier éventuellement à un signalement ou une alerte ce qui a été approuvé par la cellule *Listeria* le 23/04/2007; (ii) dans le cas d'un signalement ou d'une alerte produit ou d'une forme neuroméningée, à différencier les souches entre elles c'est-à-dire ayant les mêmes profils *AscI* et *ApaI* mais avec un profil *SmaI* différent ce qui permet à l'InVS de faire des clusters d'investigations ou d'écarter des cas humains ou des produits alimentaires. Ce typage par *SmaI* a été réalisé sur 30% des souches humaines en 2008 comme en 2007 et sur 17% des souches totales reçues au CNRL contre 18% en 2007 (à savoir que des souches typées en 2008 étaient des souches réceptionnées en 2007). En cas d'épidémie ou

de crise, le CNRL peut multiplier par 3 sa capacité de typage par utilisation des équipements du CNR des *Vibrio*, du CNR de la résistance aux antibiotiques et de structures transversales après accord des responsables de ces entités.

- **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.
- **Caractérisation, dans des cas particuliers, de la virulence des souches de *L. monocytogenes*** par inoculation par voie orale ou parentérale sur gerbilles ou souris transgéniques humanisées ou/et par des tests *in vitro*.

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 2008, le CNRL a reçu un total de 1525 souches** (contre 1544 souches en 2007) dont 319 souches d'origine humaine, 860 souches d'origine alimentaire, 107 souches d'origine environnementale dans le cadre d'alertes sanitaires, d'investigations ou de demandes client, 11 souches d'origine vétérinaire, 10 souches sans information et 218 souches de pays étrangers dans le cadre des activités du CCOMS (cf. chapitres 2.3.3).

2.1.1.2 TECHNIQUES DEVELOPPEES EN 2008

Développement d'une méthode de référence d'isolement de *L. monocytogenes* des selles

Personnes responsables du projet au CNRL : H. Dieye - A. Leclercq – M. Lecuit

L'infection à *L. monocytogenes* peut se manifester par une gastroentérite mais le biologiste ne possède pas de méthodologie pour investiguer correctement la présence de *L. monocytogenes* dans les selles de patients. Le CNRL a mis au point une méthode permettant de détecter dans les selles *L. monocytogenes* et a expertisé 4 selles dont 3 se sont révélées positives à *L. monocytogenes*. La caractérisation des souches par macrorestriction d'ADN a montré leur similitude avec la souche issue du même patient et isolée du sang (septicémie). Les

caractéristiques génotypiques et phénotypiques de ces souches sont en cours d'investigation.

2.1.1.3 METHODES EN DEVELOPPEMENT

Développement d'un schéma de référence de multilocus variable-number of tandem repeat analysis (MLVA) pour L. monocytogenes

Personnes responsables du projet au CNRL : V. Chenal Francisque –M. Cantinelli - A. Leclercq - M. Lecuit

Collaboration avec la plate-forme de génotypage des pathogènes et santé publique PF8 de l'Institut Pasteur et l'unité de recherche du Professeur G. Vergnaud (Institut de génétique et Microbiologie, Université Paris-Sud, Orsay).

Une étude comparative *in silico* de 17 génomes séquencés de *L. monocytogenes* a abouti à la mise au point d'une liste de *Variable Number Tandem Repeat* (ou répétition en tandem polymorphe) potentiels pour développer un schéma fiable de typage moléculaire par MLVA (Multiple Loci VNTR Analysis ou Analyse de plusieurs locus VNTR). Les VNTR potentiels du schéma MLVA ont été validés *in silico* sur 4 nouvelles souches séquencées puis au laboratoire sur les ADN génomiques de 40 souches de *L. monocytogenes* en déterminant les allèles des différents loci sur gel d'agarose.

Les premiers résultats ont abouti à la sélection de 8 VNTR d'intérêt. Une revue de la littérature a permis de sélectionner d'autres VNTR dont les allèles vont être déterminés par électrophorèse capillaire et séquençage sur 16 souches de *L. monocytogenes* représentant les complexes clonaux de l'étude MLST du CNRL sur la biodiversité des souches cliniques françaises. Les performances de ce schéma MLVA, notamment quant à son pouvoir discriminant, seront comparées à celles de deux autres méthodes de typage moléculaire sur 90 souches françaises. Le but est l'obtention d'une méthode de typage en 8 heures suivant l'extraction de l'ADN, ce qui constitue un gain de temps substantiel pour la surveillance, notamment dans le cadre de la gestion d'alertes sanitaires.

Sérotypage des Listeria

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

Le CNRL a été confronté depuis 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* effectué au moyen du seul kit complet commercialisé. Bien qu'ayant alerté les responsables de ce fabricant, nous n'avons à ce jour aucune réponse. Le CNRL ne recommande donc plus ce kit pour le sérotypage complet des *Listeria monocytogenes*. Le sérovar 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 typées antérieurement à la mise au point du sérogroupage PCR. Dans d'autres cas la demande de sérotypage est motivée par

l'analyse de souches environnementales, notamment de sérovars 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. Pour cela, le CNRL a produit des sera 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 sérum IX servant à déterminer le sérovar 4ab semble difficile à produire, du fait d'une faible efficacité de l'immunisation, et le protocole d'obtention de ce sérum est en cours d'optimisation.

2.1.1.4 METHODES EN COURS DE VALIDATION

2.1.1.4.1 EVALUATION DES KITS DE SERODIAGNOSTIC ET DE PCR

L'évaluation des kits de sérodiagnostics de la listériose utilisés notamment dans le cadre du diagnostic de l'infection de la femme enceinte et des kits de PCR dans le cadre du diagnostic des formes neuroméningées est nécessaire, et pourrait conduire à inclure les cas d'infections neuroméningées au cours desquels *L. monocytogenes* ne serait pas isolée mais la PCR serait positive. La Cellule *Listeria* et l'InVS sont donc intéressés à ce que le CNRL évalue la qualité et l'intérêt de ces tests biologiques.

Le CNRL n'est pas un laboratoire d'analyse médicale et ne reçoit donc pas actuellement de prélèvement biologique humain dans un objectif de diagnostic de première intention. Il ne dispose donc pas à ce jour d'échantillons biologiques issus de cas ou de témoins pour évaluer la qualité et les performances de ces kits et préciser leur intérêt dans la démarche diagnostique.

Le CNRL a donc décidé de mettre en place une étude prospective permettant de recueillir toutes les données cliniques de patients atteints de listériose mais également les échantillons biologiques issus de ces patients, afin notamment de constituer une bibliothèque permettant d'évaluer ces outils diagnostics. Un projet dans le cadre du programme hospitalier de recherche clinique (PHRC), sous la direction du Pr. M. Lecuit et coordonné par le Dr C. Charlier, Chef de Clinique du service des Maladies infectieuses de l'hôpital Necker-Enfants malades a été déposé fin 2008. Il implique le CNRL, l'InVS et le service des Maladies infectieuses et tropicales de l'hôpital Necker-Enfants malades. Il est brièvement présenté ci-après.

2.1.1.4.1.1 PROJET MONALISA : MULTICENTRIC OBSERVATIONAL NATIONAL ANALYSIS OF LISTERIOSIS AND *LISTERIA*

Etude prospective sur la listériose en France incluant tous les cas de listériose éligibles depuis Janvier 2010. Elle est financée par un programme hospitalier de recherche clinique (PHRC national) ainsi que l'Institut Pasteur. L'APHP est promoteur de l'étude.

Contacts :

Promoteur : Assistance Publique-Hôpitaux de Paris

Délégation Régionale à la Recherche Clinique Carré
Historique - Hôpital Saint-Louis 1 avenue Claude
Vellefaux 75010 Paris Tel: 01 44 84 17 20 Fax: 01 44
84 17 99

Investigateur coordonnateur : Dr Caroline Charlier

Service de Maladies Infectieuses et Tropicales, Hôpital Necker-Enfants Malades APHP,
149 rue de Sèvres 75015 Paris, Centre d'Infectiologie Necker-Pasteur
Tel: 01 42 19 26 63
Fax: 01 42 19 26 22
E-mail : caroline.charlier@nck.aphp.fr

Responsable scientifique : Pr Marc Lecuit

Centre National de Référence *Listeria*, Centre collaborateur OMS *Listeria*,
Groupe "Microorganismes et Barrières de l'Hôte", Équipe Avenir Inserm U604
Institut Pasteur, 25 rue du Dr Roux, 75724 PARIS cedex 15
Service de Maladies Infectieuses et Tropicales, Hôpital Necker-Enfants Malades APHP,
149 rue de Sèvres 75015 Paris, Centre d'Infectiologie Necker-Pasteur
Tel: 01 40 61 34 20
Fax: 01 40 61 34 21
E-mail : marc.lecuit@pasteur.fr

2.1.1.4.2 EVALUATION DU MILIEU ALOA-CONFIRMATION™

Afin d'optimiser l'identification de l'espèce *L. monocytogenes*, une gélose chromogène détectant l'activité de la PIPLC (Phosphatidylinositol-specific phospholipase C) et l'utilisation du Rhamnose par *L. monocytogenes* a été mise au point par la firme AES Laboratoires (Combourg, France) : ALOA-Confirmation™.

En étudiant sa collection et en caractérisant à nouveau les souches historiques rhamnose négatives, seulement 20 souches ont été retrouvées finalement rhamnose négative ou lente. Ces souches ont été pour certaines rencontrées ces dernières années, ce qui a perturbé la conclusion d'identification des laboratoires correspondants. Si le caractère xylose est toujours négatif sur l'ensemble des souches de notre collection, ce n'est apparemment pas le cas pour les souches rhamnose positive. Il faut considérer qu'il s'agit de moins de 1% des souches du CNRL, ces souches sont donc rares. Afin de tester ces souches, le producteur de ce milieu a sollicité le CNRL, afin de confirmer les résultats que nous avons trouvés avant leur publication.

Cependant, compte tenu de la rareté de ces souches, les laboratoires médicaux peuvent optimiser leur identification par une simple gélose d'identification puisqu'environ 8 souches peuvent être testées simultanément par repiquage.

2.1.1.4.3 EVALUATION DES *L. MONOCYTOGENES* 4AB

Suite à la constatation par le CNRL que des homologues étrangers et des laboratoires français avaient des difficultés à sérotyper les souches de *L. monocytogenes* de sérovar 4ab en raison de la mauvaise qualité du sérum IX des kits, le CNRL s'est posé la question de l'appartenance réelle de ces souches dites 4ab à l'espèce *monocytogenes* et si le sérovar était correctement déterminé. Dix-neuf souches collectées au cours du temps par le CNRL ont été examinées et investiguées avec les outils de biologie moléculaire dont dispose le CNRL. Il semble que ces souches dites *L. monocytogenes* 4ab ne soient en fait pas de l'espèce *monocytogenes*, mais *innocua*, ce qui pourrait expliquer les difficultés de sérotypage.

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 1990). 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*, qui présente un intérêt clinique dans le domaine vétérinaire, et exceptionnellement en pathologie humaine.

Depuis 2007, le CNRL a constaté que certains laboratoires de Biologie Médicale correspondants attendent parfois d'avoir la confirmation de l'identification *L. monocytogenes* par le CNRL pour effectuer la DO.

Le CNRL a saisi la cellule *Listeria* en Août 2007 sur ce point afin qu'une communication soit faite par les DDASS pour que la DO soit effectuée avant l'envoi au CNRL pour optimiser les performances du système de surveillance.

On considère qu'il existe 8 catégories de souches envoyées au CNRL :

1. **souches humaines** : souches cliniques
2. **alerte sanitaire** : souches d'origine alimentaire ou issues de l'environnement de ces aliments, isolées dans le cadre d'investigation de cas groupés ou épidémiques et lors d'enquêtes ponctuelles autour d'un cas à la demande de l'InVS, de la DGS, de la DGAL ou de la DGCCRF.
3. **alerte produit** : souches d'origine alimentaire ou issues de l'environnement de ces aliments isolées dans le cadre de contrôles officiels ou autocontrôles faisant l'objet d'une

alerte DGAL avec saisie, ou retrait, ou rappel de produit. Ces « alertes produits » correspondent soit à des non-conformités aux critères réglementaires fixés pour les aliments (présence de *L. monocytogenes* ou dépassement du seuil de 100 *L. monocytogenes*/g-ml), soit parfois à des situations considérées par la DGAL comme une menace pour la santé publique.

4. **plans de surveillance/contrôle et contrôles officiels** placés sous la responsabilité de la DGAL et de la DGCCRF. Pour cette catégorie, dès lors que l'on se trouve en situation d'alerte telle que décrit au point 3 ci-dessus, la souche passe de la catégorie 4 à la catégorie 3.
5. **autocontrôles** : Les souches provenant de « clients » particuliers (industriels dans le cadre d'autocontrôles, 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 terme d'exhaustivité de l'information recueillie ;
6. **santé animale** : souches transmises par les laboratoires vétérinaires départementaux (LVD) dans le cadre de la santé animale.
7. **études et projets de recherche** : souches isolées lors d'enquêtes, études et recherches, sur un type de produit, une filière, etc.
8. **environnement** : Les souches environnementales (origines hydriques, aliments pour animaux, sol, boues de station d'épuration, etc.)

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, 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 du genre *Listeria* et de l'espèce *L. monocytogenes* ayant des propriétés originales (1 souche en 2008) 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 2008, le CNRL a sollicité 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. Onze 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 CNRL et qu'ainsi ces souches ne rentraient pas dans la surveillance nationale de la listériose (Règlement européen EC 2003/99). Pour exemple, 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 103.500 souches à la fin de l'année 2008. 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 CNRL 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.

Certaines de ces souches sont actuellement utilisées dans le cadre de plusieurs projets de recherche concernant notamment l'étude de l'évolution des populations de *Listeria* et sur l'évolution de l'antibiorésistance des *Listeria*. Ces souches sont conservées en gélose profonde dans des pièces à température contrôlée. Un état des lieux de cette collection est actuellement en cours : il vise à vérifier la viabilité des souches et les données associées afin de les référencer à terme au sein de la base informatisée générale de données du CNRL.

- 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 constituent 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 sérovars 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 CNRL 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 2008 n'a été effectuée. Chaque sérum représenterait un coût annuel de production de 800 euros. Une production annuelle des sera pour les *Listeria* représenterait 23% du budget de fonctionnement du CNRL.

2.1.2.3 LES BACTERIOPHAGES

Le CNRL possède la collection de bactériophages de lysotypie du Centre International de Lystopie des *Listeria*. Cette collection est en cours d'évaluation et représente un regain d'intérêt suite aux nouveaux outils diagnostiques développés basés sur les phages, pour leur utilisation en « phagothérapie » et le traitement des denrées alimentaires telles que le fromage.

2.1.2.4 DIFFUSION ET ECHANGE DE MATERIEL BIOLOGIQUE

→ En 2008, un envoi a été réalisé sous MTA (Material Transfert Agreement) par l'Université d'Edinburgh, Ashworth Laboratories, Royaume-Uni. Ceci concernait 120 souches de *L. monocytogenes* et 8 souches de *L. ivanovii*.

Le CNRL a proposé aux équipes de recherche collaborant avec lui 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. Ceci a été réalisé sur 20 souches dans le cas de collaborations sur des études de biodiversité des souches de *L. monocytogenes*.

→ En 2008, le CNRL a envoyé 3 souches d'alertes produits ou de plan de surveillance et 332 souches d'alertes produits au LNRI (Laboratoire National de référence des *Listeria monocytogenes*).

2.1.2.5 CONDITIONS DE MISE A DISPOSITION DE CES COLLECTIONS

Les échanges des souches de collections avec un tiers font l'objet d'un MTA, permettant de juger de la pertinence de la demande, de la possible redondance avec des projets en cours au CNRL, et de la capacité du demandeur à exercer les responsabilités attenantes à ces souches, d'assurer leur non diffusion à des tiers à des fins de recherches ou commerciales, et déterminer d'éventuelles règles de publications.

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

Par ailleurs, dans le cas de la réception d'un prélèvement en vue de la réalisation d'une PCR sur échantillons biologiques ou de sérologie, le CNRL transfère actuellement la demande au service de Microbiologie de l'Hôpital Necker-Enfants malades.

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 : isolement sur gélose ALOA™ ou géloses équivalentes

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 sérovars 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. À noter les problèmes d'interprétation de la sensibilité aux sulfamides et dérivés sur gélose MH supplémentée au sang.

- *Sérodiagnostic*

Le CNRL ne peut effectuer de recommandations faute d'études prospectives sur de larges cohortes décrivant les performances des tests actuellement disponibles. 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'un fragment de la protéine, LLO-411. Des titres de 1/100 à 1/5000 sont constatés dans l'infection aiguë. La positivité semble le plus souvent associée à une infection évolutive avec foyers profonds notamment dans les cas d'encéphalite et des infections évoluant depuis plusieurs jours, car la séroconversion semble tardive notamment dans le cas des infections materno-fœtales. Dans le cadre de patients septicémiques, ses performances semblent moindres. Compte tenu de l'existence d'une possible réactivité aux dilutions faibles (à rapporter à de possibles immunisations antérieures asymptomatiques), il est indispensable de réaliser deux tests à 15 jours d'intervalle pour affirmer une séroconversion. La séroconversion affirme une infection invasive récente.
- La méthode de séroagglutination avec des anticorps contre des bactéries tuées : kit commercial Dade Berhing (Suspensions de *Listeria* O et H). 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),
- Taqman® *Listeria monocytogenes* detection kit (APPLIED BIOSYSTEMS)
- 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 CNRL recommande de suivre les instructions de l'Office 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 en cours de révision, 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>. Concernant les méthodes d'identification commerciale des *Listeria*, la norme NF EN ISO 7218 version 2007 régissant les principes de l'examen microbiologique des aliments demande au laboratoire de faire valider leur choix technique par un laboratoire national agréé. De ce fait, le CNRL tient à jour une liste des moyens d'identification commerciaux mais recommande l'utilisation de la galerie API *LISTERIA* (bioMérieux)

En tout état de cause, le CNR des *Listeria* recommande à ses laboratoires correspondants ou interlocuteurs de se conformer aux recommandations émanant du Laboratoire National de Référence des *Listeria monocytogenes* situé à l'AFSSA-LERQAP (Maisons-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
Rapid <i>Listeria</i> spp	Milieux de culture Détection des <i>Listeria</i> spp	BIO-RAD
Ottaviani Agosti Agar	Milieux de culture Détection des <i>Listeria</i> spp	BIOMERIEUX
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
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
BAX® <i>Listeria</i> spp 24E	PCR - Détection des <i>Listeria</i> spp	DuPont Qualicon
iQ Check <i>Listeria</i> spp	PCR - Détection des <i>Listeria</i> spp	BIO-RAD

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
Ottaviani Agosti Agar	Milieux de culture Dénombrement des <i>Listeria monocytogenes</i>	BIOMERIEUX
AL Recherche	Milieux de culture Détection des <i>Listeria monocytogenes</i>	BIO-RAD
AL Dénombrement	Milieux de culture Détection des <i>Listeria monocytogenes</i>	BIO-RAD
Rapid L'Mono (Recherche)	Milieux de culture Détection des <i>Listeria monocytogenes</i> et <i>Listeria spp</i>	BIO-RAD
Rapid L'Mono (Dénombrement)	Milieux de culture Détection des <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 monocytogenes</i>	CHROMagar
<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 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 monocytogenes</i>	SOLABIA / Division BIOKAR DIAGNOSTIC

Tableau 3 (suite) : 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
Transia Plate <i>Listeria monocytogenes</i>	Tests immuno-enzymatiques Détection des <i>Listeria monocytogenes</i>	BioControl Systems
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
GeneDisc Cyler <i>Listeria monocytogenes</i>	PCR Détection des <i>Listeria monocytogenes</i>	GENESYSTEMS
IQ Check <i>Listeria monocytogenes</i>	PCR Détection des <i>Listeria monocytogenes</i> / Detection of <i>Listeria monocytogenes</i>	BIO-RAD
BAX® <i>Listeria</i> mono 24E	PCR Détection des <i>Listeria monocytogenes</i>	DuPont Qualicon
Lumiprobe 24 <i>Listeria monocytogenes</i>	Tests d'hybridation moléculaire Détection des <i>Listeria monocytogenes</i>	EUROPROBE SA
Accuprobe <i>Listeria monocytogenes</i>	Tests d'hybridation moléculaire Détection des <i>Listeria monocytogenes</i>	GEN-PROBE Inc

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[®] (Epiconcept) est utilisé depuis le 1er janvier 2005 et a été l’objet d’une déclaration auprès de la CNIL. 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 2008 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 10.000 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.

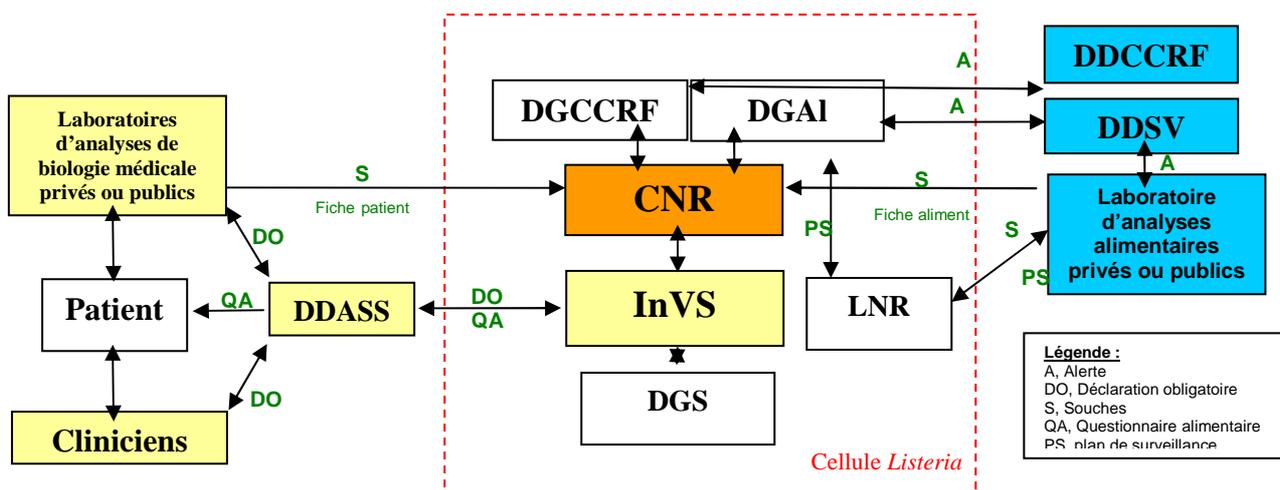
☒ Fin 2008, il a été entrepris des études de faisabilité concernant une informatisation complète de la surveillance nationale, dans le but notamment de faciliter la réalisation de l’enquête prospective nationale MONALISA, par le remplissage d’un dossier sécurisé sur le web au moyen du logiciel VOOZANOO[®] (Epiconcept, France) en projet.

2.2 SURVEILLANCE DE LA LISTERIOSE HUMAINE EN FRANCE

Une des missions clés du CNRL est sa participation active à la surveillance microbiologique et épidémiologique des cas de listériose en France ainsi qu'aux investigations destinées à identifier le véhicule alimentaire responsable des cas (FAO & WHO, 2002 ; 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), et 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 (i) la détection des cas groupés de listériose, (ii) 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, (iii) leur gestion et leur prévention. Au sein de cette « Cellule *Listeria* », l'InVS et le CNRL 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* ; LNR : Laboratoire National de référence ; 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.

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 (basées 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.

Depuis mars 2005, la caractérisation des souches 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 2008, 319 souches d'origine humaine ont été reçues concernant 267 cas diagnostiqués par des laboratoires de France métropolitaine et 5 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 2008 et inclut nécessairement des souches reçues au CNRL en 2009 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 épisode de 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 CNRL), 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 CNRL (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 CNRL, 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 (séro groupe 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 également les échanges de profils standardisés entre bases compatibles ainsi que la constitution d'une nomenclature des profils. Le logiciel Bionumerics est utilisé en routine depuis Septembre 2006 et a permis d'optimiser la surveillance microbiologique et épidémiologique à partir du CNRL.

→ En 2008, 9 signalements ont été investigués.

2.2.3 PHASE DE SURVEILLANCE RENFORCEE

Tout signalement est suivi d'une phase de surveillance renforcée durant laquelle le CNRL 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* peut 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 CNRL.

En fonction des informations rassemblées, la cellule décide des actions et investigations à mettre en œuvre par la Cellule et leurs services. Il s'agit par exemple d'analyser les informations disponibles (résultats des contrôles, retraits de produits, etc.), de demander la transmission au CNRL 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 CNRL 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.

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 CNRL un arrêt partiel, voire total, et immédiat des autres activités durant la période des investigations.

2.2.5 SURVEILLANCE DE LA RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES

La surveillance de la résistance aux antibiotiques était antérieurement effectuée 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.

Depuis janvier 2007, la sensibilité des souches humaines est 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 résistantes 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 à 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 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 rapide aux biologistes qui en font la demande. Les résultats de la surveillance des souches d'origine humaine isolées en 2008 sont présentés dans le chapitre 3.1.5.

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 2008, ce mode de transmission a été suspecté à 4 reprises. Cependant, aucun épisode d'infection nosocomiale n'a pu être formellement prouvé.

2.3 CONTRIBUTION AUX RESEAUX DE SURVEILLANCE EUROPEENS ET 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 notamment en matières premières et 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, ce qui implique de ne pas cantonner la surveillance de la listériose et des *Listeria* à la France.

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 s'intéressent à l'espèce *monocytogenes* du genre *Listeria* et aux souches alimentaires ainsi que vétérinaires reliées aux contrôles des zoonoses. Ils ont également pour mission l'étude de l'antibiorésistance des souches zoonotiques et ils participent à la mise au point de méthodes d'essais dans le domaine alimentaire et vétérinaire pour la détection, l'énumération et la caractérisation des *L. monocytogenes*.

En 2007, le CCOMS/CNRL a interrogé le LNRI/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 CNRL/CCOMS (Cf. Chapitre 5)).

En 2008, le CNRL et le CCOMS ont présenté les résultats de la fréquence de ces souches actuellement rencontrées lors de la journée annuelle des LNR et des LCR en présence de la Commission Européenne DG SANCO. Le CNRL continue d'investiguer les causes de ce caractère non hémolytique et son impact sur la virulence de ces souches.

2.3.2 EUROPEAN CENTER FOR DISEASES CONTROL: ECDC

En 2008, le CNRL et l'InVS ont participé à la première conférence du réseau européen des maladies d'origine hydrique et alimentaire (FWD) de l'ECDC et au groupe de réflexion *Listeria* pour recenser les besoins en termes de surveillance européenne.

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

Le laboratoire est également Centre Collaborateur de l'OMS pour la listériose d'origine alimentaire.

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 ayant travaillé sur l'étude des stades de la contamination par *L. monocytogenes* de la filière porcine). En 2008, le CCOMS a accueilli et formé un stagiaire portugais (Dr. G. Almeida, Université Catholique du Portugal) dans l'objectif de l'aider à mettre en place une structure de surveillance au Portugal.
- 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 recueil, pour le compte de l'OMS, des informations sur le bioterrorisme en ce qui concerne *Listeria monocytogenes* dans l'alimentation.

En 2008, le CCOMS a reçu 218 souches adressées par 3 laboratoires étrangers (contre 232 en 2007). Deux souches dans le cadre d'une alerte Européenne avec demande de la DGAI de récupération des souches pour connaître la circulation de ces souches sur le territoire français. Une souche provenant d'un laboratoire italien d'analyse médicale. 122 souches humaines et 93 souches alimentaires du Portugal dans le cadre de la mise en place d'un système de surveillance dans ce pays ainsi que d'une étude sur la contamination des fromages portugais et leurs liens avec les souches humaines.

→ En 2008, le CCOMS a apporté son aide et son expertise au Chili dans le cadre d'une prestation de typage moléculaire de souches et d'interprétation de profils pour une publication.

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 2008, notre laboratoire a soumis sa candidature pour une nouvelle mandature comme CCOMS *Listeria*.

→ En 2008, l'OMS a sollicité notre laboratoire au sujet d'une extension du réseau **Global Salm-Surv** à *Listeria monocytogenes* (<http://www.who.int/salmsurv/en/>) et un laboratoire de la République Tchèque a proposé l'organisation d'une session de formation OMS zone Europe sur *Listeria* en collaboration avec le CCOMS.

2.3.4 PULSENET EUROPE

Dans le cadre du 6^{ème} PCRD de l'Union Européenne (DG-Recherche), notre laboratoire 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 effectuée 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 Listeria 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 2008, le CNRL a effectué ses analyses de macrorestriction d'ADN sous certificat EQAS 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 CNRL a proposé à l'ECDC de réactiver Pulsenet Europe et de le conforter par la réalisation du projet Listernet d'un réseau de surveillance de la listériose en Europe.

2.3.5 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.

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 2008 et la souche caractérisée par le CNRL. Ceci inclut donc les souches reçues au cours du premier trimestre 2009 compte tenu des retards dans l'envoi des souches au CNRL.

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

3.1.2 ANALYSE GLOBALE DES CAS DE LISTERIOSE

Nombre total de cas

En 2008, le CNRL a reçu 319 souches représentant 277 cas (hors 42 doublons) de suspicion de listériose.

Pour 4 cas (1,5 % contre 1,3% en 2007 soit 4 cas), le CNRL n'a pas confirmé le diagnostic de listériose puisqu'il s'agissait de souches n'appartenant pas au genre *Listeria*. Il s'agissait dans deux cas d'un isolat d'hémocultures, dont un provenant d'une femme enceinte, dans un cas d'un LCR, dans un cas d'un isolat issu d'un prélèvement vaginal. En accord avec l'InVS, un cas de prélèvement vaginal positif à *L. monocytogenes* n'a pas été retenu comme cas de listériose.

En 2008, les échantillons biologiques (LCR, sérum) adressés au CNRL dans le cadre du diagnostic de suspicion de listériose n'ont pas été analysés par le CNRL (Ces prélèvements ont été communiqués au service de microbiologie de l'hôpital Necker-Enfants Malades). En revanche, quatre selles avec suspicion de présence de *L. monocytogenes* ont été expertisées par le CNRL et trois selles furent positives à *L. monocytogenes*. La caractérisation des souches par macrorestriction d'ADN a montré leur similitude avec la souche issue du même patient atteint de septicémie. Un échantillon de biopsie de coque d'hématome du genou compliquant une infection à *L. monocytogenes* a été expertisé également par le CNRL sans confirmation de la présence de *L. monocytogenes* par PCR.

Au total, le CNRL retient donc 272 cas de listériose pour l'année 2008, confirmés par l'InVS. Ces cas étaient répartis en 267 cas en provenance de France métropolitaine et 5 cas en provenance des Départements et Territoire d'Outre-mer (DOM-TOM) [Martinique (3), Réunion (2)]. Les 5 cas des DOM-TOM sont analysés dans le chapitre 3.1.4. Il est à noter que deux patients (DOM-TOM (1 cas/septicémie), Belgique (1 cas/septicémie)) ont été hospitalisés pour une listériose sur le territoire français métropolitain et ont été comptabilisés dans les cas de France métropolitaine.

Taux d'exhaustivité

La surveillance de la listériose en France est fondée sur la complémentarité de 2 sources de recensement des cas : la notification 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 2008, 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 DDASS pour la récupération des souches dans un objectif épidémiologique.

La comparaison des 2 systèmes (CNRL/InVS) en 2008 montre **un taux d'exhaustivité de 99 %** (contre 98% en 2007) de l'envoi des souches par rapport à l'ensemble des cas recensés par les 2 systèmes. Cependant dans 3 cas, la souche n'a pas été envoyée au CNRL parce qu'elle n'a pas été conservée par le laboratoire (2 cas) ou n'est pas encore parvenue au CNRL (1 cas).

A noter que la relance des biologistes par l'InVS a permis de récupérer 7 souches dont la plus récente a été reçue en Février 2009.

Laboratoires expéditeurs

Parmi les 277 souches qui ont été envoyées pour suspicion de listériose, 251 (91 %) proviennent de laboratoires de centres hospitaliers et 26 (9 %) de laboratoires privés.

- 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 6,6 jours (contre 10,3 jours en 2007, 11 jours en 2005 et 9 jours en 2004) [compris entre 1 et 193 jours] (Figure 3).

Ce délai qui reste élevé entre l'isolement de la souche et la réception de la souche au CNRL est lié aux difficultés du transport des souches ou des produits biologiques vers les CNRs, surtout par le réseau postal. Pour éviter son allongement, le réseau CNRL-InVS-DDASS effectue les relances nécessaires de façon coordonnée pour l'envoi des souches par nos correspondants. L'amélioration constatée en 2008 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 8,7 jours en 2008 contre 9 en 2007 [compris entre 1 et 42 jours (Figure 4)]. 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 (compte-tenu des différentes étapes). Le respect de ces délais est devenu une des priorités du CNRL. Pour 90 % des souches comme en 2007, 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 ou à des propriétés particulières de certaines souches comme une croissance très faible (par ex. dans le cadre de souches issues d'une infection sur prothèse de hanche).

➔ En cas d'urgence ou de demandes de la Cellule *Listeria*, le délai moyen en 2008 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. Le CNRL a eu recours à ces analyses accélérées qui sont confirmées par une analyse de référence réalisée en parallèle.

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 et de leur

place essentielle dans la surveillance microbiologique de la listériose, qui est basée sur le recueil des données issues de leur laboratoire. Cependant, la question du coût de l'envoi des souches, commune à d'autres CNRs, semble pouvoir constituer un frein à l'envoi des souches au CNRL. Cette question n'est pas apparue comme limitante en 2008, contrairement aux années antérieures, car un transporteur, après négociation avec l'Institut Pasteur, a facilité la remontée des souches vers le CNRL.

Figure 3 : Distribution des souches d'origine humaine isolées en 2008 selon le délai entre le prélèvement et la réception au CNRL (en rouge, la médiane).

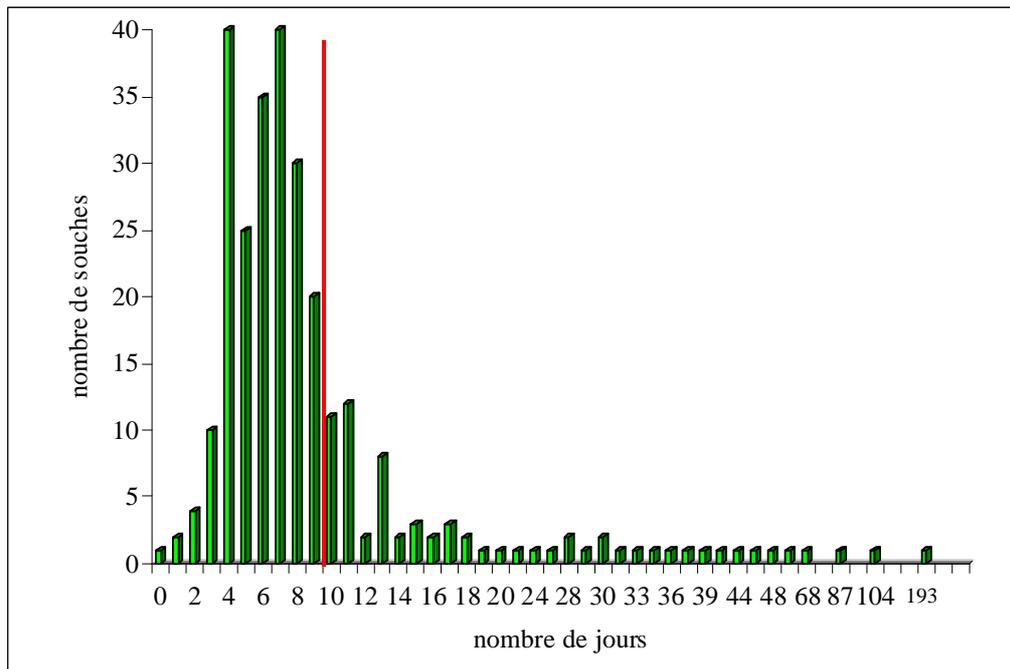
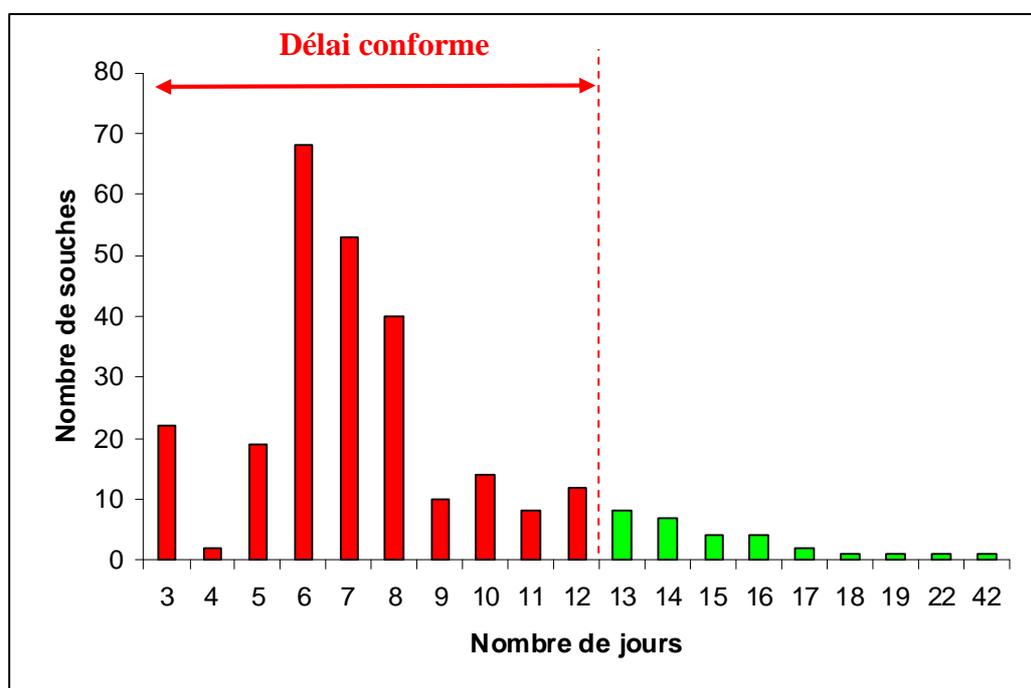


Figure 4 : Distribution des souches isolées en 2008 selon le délai entre la réception de la souche au CNRL et l'envoi du rapport d'essai. En rouge, le délai conforme aux procédures du CNRL.



3.1.3 CAS DE LISTERIOSE EN FRANCE METROPOLITAINE

Le nombre de cas recensés en 2008 par le CNRL provenant de la France métropolitaine est de 272. Après une augmentation depuis 2005 comme dans de nombreux pays européens, le nombre de cas de listériose diagnostiqués en 2008 est similaire à celui de 2006 (272 cas) sans qu'aucun épisode épidémique n'ait été détecté (Figure 5). En 2008, le taux d'incidence moyen des cas de listériose sporadique était de 4,3 cas par million d'habitants (contre 4,6 cas par million d'habitants en 2006 et 5 cas par million d'habitants en 2007). En 2008, il s'agit donc d'un niveau proche de l'incidence de 2006.

Le nombre de souches associées à un signalement est constant 66 (24%) en 2008 contre 20% en 2007 mais le nombre de signalements en 2008 est inférieur à celui de 2007. Cependant, aucune source commune n'a pu être identifiée pour ces 9 signalements.

- 2008 :** 272 cas.
- 2007 :** 299 cas ;
- 2006 :** 272 cas ;
- 2005 :** 206 cas ;
- 2004 :** 231 cas ;
- 2003 :** 191 cas ;
- 2002 :** 211 cas dont 11 liés à la consommation de saucisse à tartiner et 3 liés à la consommation de mortadelle ;
- 2001 :** 181 cas ;
- 2000 :** 245 cas, dont 3 liés à la consommation de rillettes et 25 liés à la consommation de langue de porc en gelée ;

1999 :	244 cas , dont 7 liés à la consommation de rillettes et 7 liés à la consommation de langue de porc en gelée ;
1998 :	229 cas ;
1997 :	242 cas , dont 14 liés à la consommation de fromages à pâte molle ;
1996 :	220 cas ;
1995 :	338 cas , dont 37 liés à la consommation de fromage à pâte molle ;
1994 :	336 cas ;
1993 :	489 cas , dont 38 liés à la consommation de rillettes ;
1992 :	734 cas , dont 276 liés à la consommation de langue de porc en gelée ;
1991 :	387 cas ;
1990 :	306 cas ;
1989 :	409 cas ;
1988 :	397 cas ;
1987 :	366 cas .

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 de Juillet (35 cas) et d’Août (30 cas) alors qu’en 2007, il s’agissait d’Août et de Septembre. La distribution temporelle des cas sur le premier semestre 2008 a évolué par rapport à l’année 2007 puisque outre le mois de Février, le mois de Janvier est aussi faible en nombre de cas (13 cas).

En conclusion, la distribution temporelle des cas, et notamment de cas groupés, est variable d’une année à l’autre. Cependant, depuis 2006, une augmentation des cas est observée le trimestre d’été. 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 (Figure 7). Comme les données européennes le signalent, un certain degré de saisonnalité est cependant observable sur le second semestre de l’année.

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

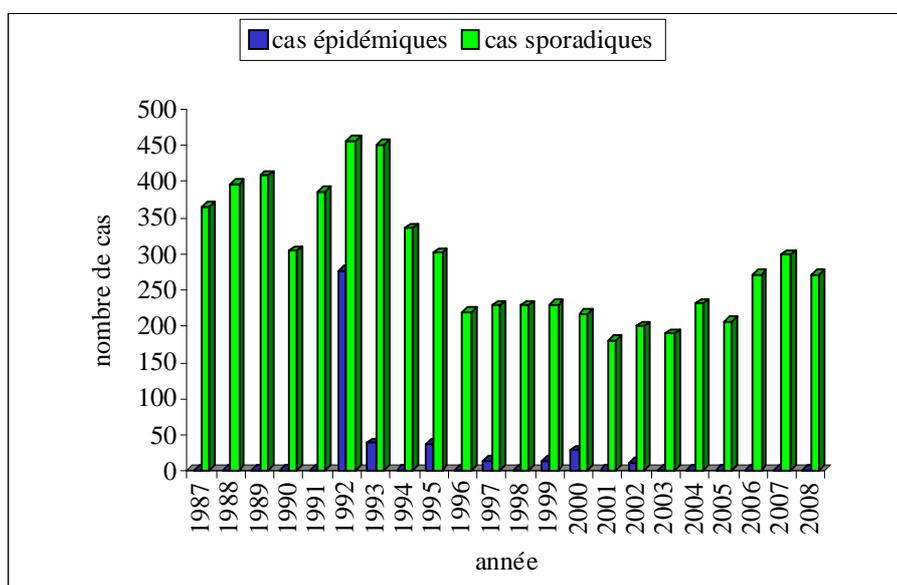


Figure 6 : Distribution mensuelle des cas sporadiques de listériose en France métropolitaine en 2008.

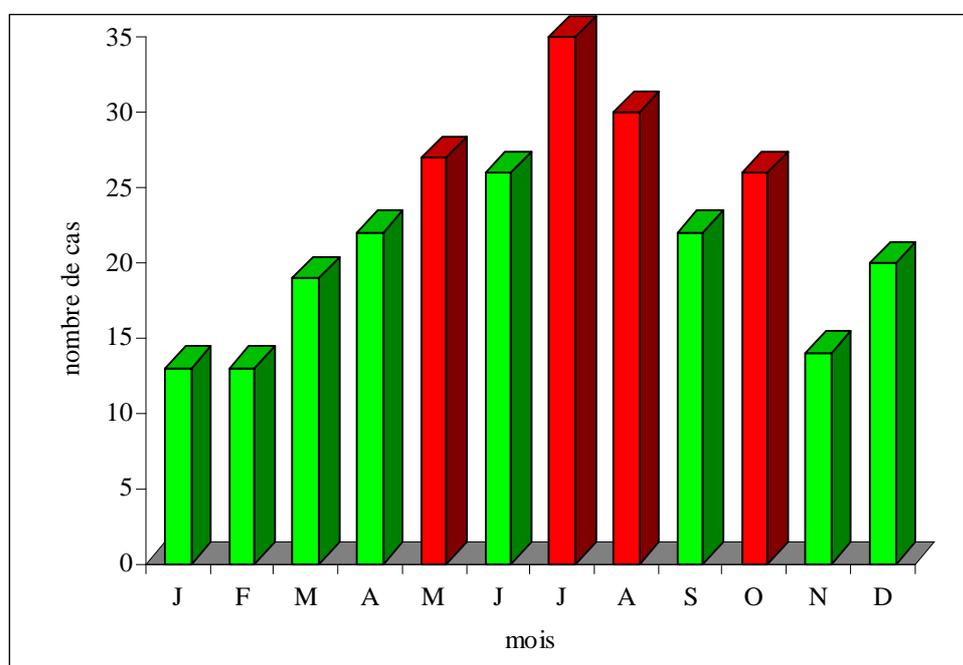


Figure 7 : Distribution trimestrielle des cas sporadiques de listériose en France métropolitaine en 2008.

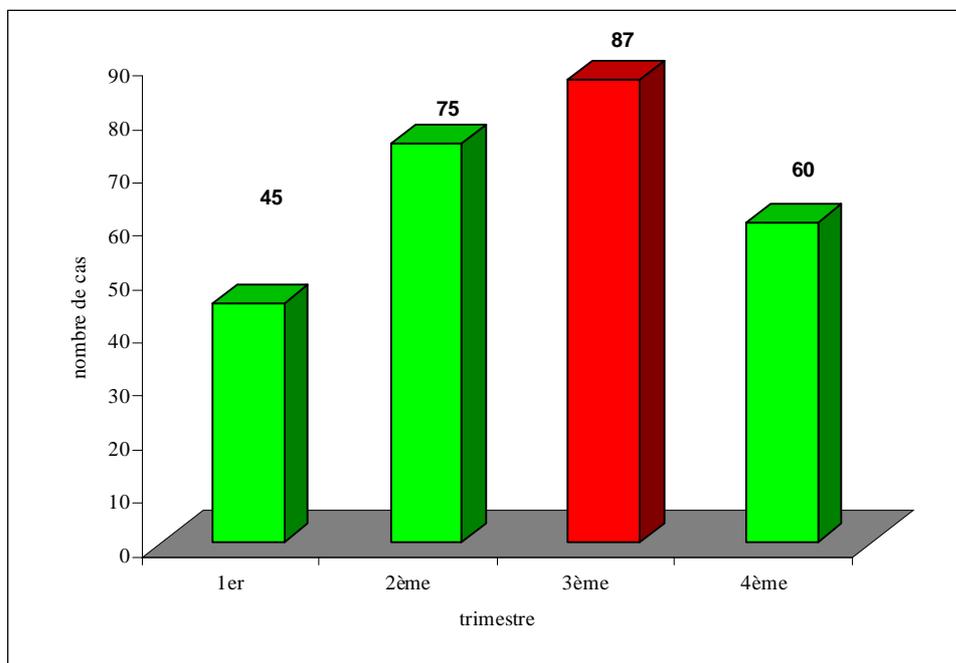
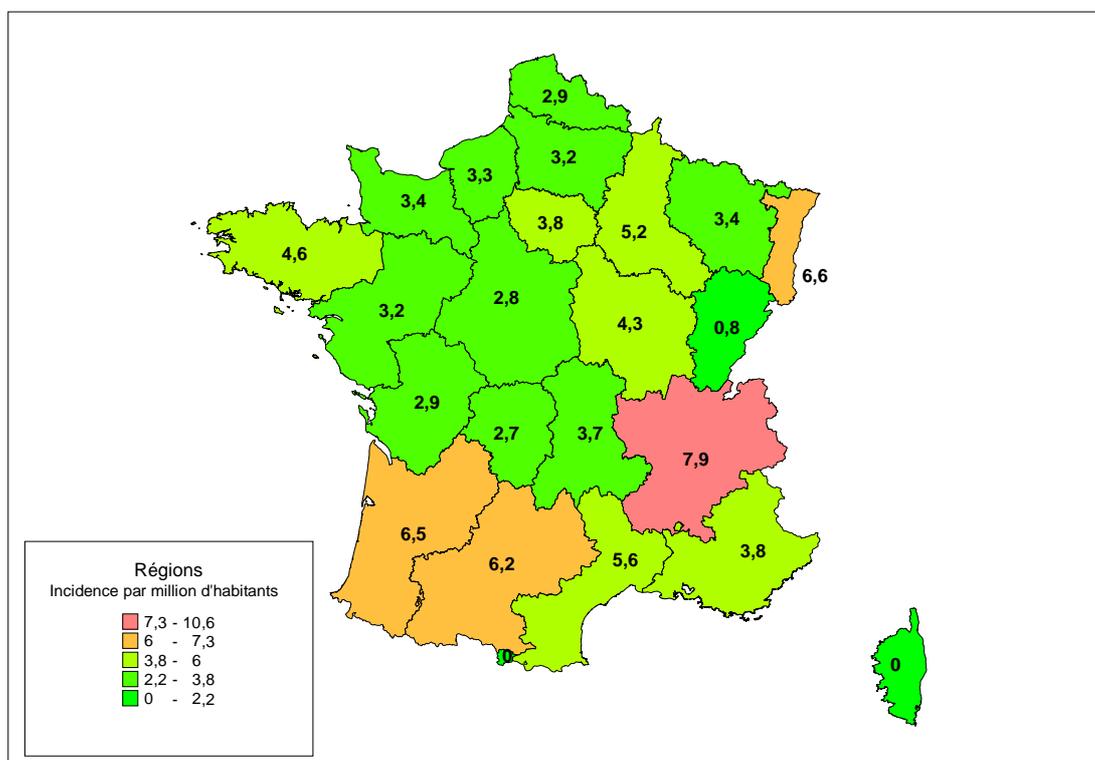


Figure 8 : Incidence régionale des cas sporadiques de listériose en 2008.



3.1.3.2 DISTRIBUTION GEOGRAPHIQUE DES CAS

La distribution géographique du nombre de cas et des incidences est représentée dans la figure 8 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 évalués par l'INSEE.

Par région (Figure 8)

- Les régions caractérisées par les incidences les plus élevées sont la région Rhône-Alpes ($8/10^6$), l'Alsace ($6/10^6$), l'Aquitaine ($6/10^6$) et le Midi-Pyrénées ($6/10^6$).

- La région caractérisée par l'incidence la plus basse est la Franche-Comté ($1/10^6$).

- Les régions caractérisées par le plus grand nombre de cas, en valeur absolue, sont Rhône-Alpes (47), Ile-de-France (44), et Aquitaine (20) et sont les mêmes qu'en 2007. Les régions caractérisées par les plus faibles nombres de cas, en valeur absolue, sont la Franche-Comté (1) et le Limousin (2).

Par département

- Les départements caractérisés par les incidences les plus élevées sont le Lot ($24/10^6$) et l'Ariège ($14/10^6$).

- Les départements caractérisés par les incidences les plus basses sont l'Ile et Vilaine ($1,1/10^6$) et le Maine et Loire ($1,3/10^6$) et 14 départements pour lesquels l'incidence est nulle (04-05-11-19-20-21-25-32-36-39-58-60-61-90-2B).

Les départements caractérisés par les plus grands nombres de cas, en valeur absolue, sont le Rhône (16) et Paris (16). Les départements caractérisés par les plus faibles nombres de cas, en valeur absolue, soit 1 cas sont : l'Allier, le Calvados, La Charente, La Charente-Maritime, Le Cher, la Creuse, l'Ile et Vilaine, les Landes, le Loir et Cher, la Haute-Loire, le Loiret, la Lozère, le Maine et Loire, la Marne, La Mayenne, La Meuse, Le Puy-de-Dôme, les Hautes-Pyrénées, les Pyrénées Orientales, la Haute-Saône, la Savoie, les Deux-Sèvres, le Tarn et Garonne, le Vaucluse, la Haute Vienne, les Vosges et l'Yonne.

Il faut noter que ces disparités 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. On ne peut notamment pas mettre en évidence de corrélation entre ces incidences et les zones de productions agricoles françaises par filière. Les départements non touchés en 2008 ne sont pas forcément les mêmes que ceux qui étaient épargnés en 2007. De même, les départements pour lesquels l'incidence en 2007 était élevée ne sont pas ceux constatés en 2008.

Cependant, on observe en 2008, 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 et dans l'Est de la France, avec dans le Sud-ouest un doublement

d'incidence pour la région Midi-Pyrénées. La Corse pour 2008 n'a rapporté qu'un seul cas. En 2007, les régions les plus touchées étaient le Sud et le Grand Ouest.

Ces disparités régionales pourraient correspondre à de réelles différences notamment en termes d'habitudes alimentaires 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	2008
Alsace	4	7	4	5	1	4	6	6	7	8	12	12
Aquitaine	12	12	13	17	15	11	11	28	13	16	32	20
Auvergne	5	11	7	4	3	6	4	6	1	6	8	5
Basse-Normandie	8	9	8	6	4	8	8	6	6	2	10	5
Bourgogne	5	6	9	6	4	6	4	9	5	9	7	7
Bretagne	15	7	12	10	8	10	10	16	13	16	15	14
Centre	10	10	8	8	4	5	7	7	7	11	8	7
Champagne-Ardenne	9	5	3	3	2	3	2	4	3	7	3	7
Corse	0	1	3	1	0	0	0	1	2	4	3	0
Franche-Comté	3	4	3	4	0	2	3	2	4	2	1	1
Haute-Normandie	8	4	9	9	3	7	3	3	5	7	4	6
Ile-de-France	40	47	45	44	43	42	37	39	36	42	63	43
Languedoc-Roussillon	6	7	6	12	2	4	5	10	7	10	7	14
Limousin	3	1	3	1	6	3	2	2	1	2	6	2
Lorraine	12	4	0	6	8	4	10	10	11	7	2	8
Midi-Pyrénées	7	12	7	9	12	7	16	15	18	25	17	17
Nord-Pas-de-Calais	13	16	17	5	8	13	10	8	15	11	21	12
Pays de la Loire	16	19	16	9	7	11	7	8	9	11	4	11
Picardie	2	4	11	5	2	6	8	4	3	12	7	6
Poitou-Charentes	5	5	7	11	6	2	6	7	2	6	8	5
Provence-Alpes-Côte-d'Azur	16	9	13	17	16	21	15	18	16	31	19	18
Rhône-Alpes	26	25	24	24	19	21	13	20	18	26	42	47
sans information	0	1	0	0	2	0	1	0	0	0	0	0
Total	225	226	228	216	175	196	188	229	202	271	299	267

3.1.3.3 DISTRIBUTION DES CAS SELON LA FORME CLINIQUE

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

Formes materno-néonatales

Vingt-sept formes materno-néonatales ont été enregistrées, représentant 10 % du nombre total de cas sporadiques pour 2008 (Figure 9). Ce nombre de cas en 2008 est inférieur de 50% à celui de 2007 et le plus faible depuis 1997. La distribution mensuelle fait apparaître des irrégularités qui suivent le plus souvent la courbe générale des cas sporadiques (Figure 10). La distribution par région est indiquée dans le tableau 5.

Formes non materno-néonatales

Deux cent quarante formes non materno-néonatales ont été enregistrées (contre 257 formes en 2007 et du même ordre que les 240 formes en 2006), soit 90 % du total des cas sporadiques pour 2008, qui se répartissent comme suit :

- 152 (57 %) septicémies,
- 70 (26 %) infections du système nerveux central,
- 18 (7 %) autres formes.

- **La proportion et le nombre absolu d'infections du système nerveux central sont en augmentation par rapport aux années précédentes.** Alors que jusqu'à présent le nombre de cas était assez stable depuis 2000, entre 40 et 60 cas/an (Figures 11 et 12). **Ce sont ces formes cliniques, ainsi que les « autres formes » (voir plus bas) qui ont le plus augmenté en 2008.**

- **Le pourcentage des formes septicémiques, après une augmentation depuis 2005, est en baisse en 2008.** Ces formes se rapprochent comme en 2007 du nombre de cas de 1992 à 1995. Ce sont ces formes cliniques qui avaient le plus contribué à l'augmentation globale du nombre de cas observée en 2006 et en 2007.

- Les formes cliniques « autres » correspondent à des atteintes focales. Elles sont en augmentation en 2008 représentant 7% (contre 4% en 2007) de tous les cas de listériose non materno-fœtale ce qui équivaut au 7% (n=16) observé en 2006. Ces infections consistaient en : infection du liquide d'ascite (6 cas), infection sur prothèse de hanche (4 cas), infection articulaire (3 cas), pleurésie récidivante (2 cas), pneumopathie lobaire (1 cas) et cholécystite (2 cas).

Figure 9 : Distribution des cas sporadiques de listériose en France métropolitaine depuis 1987 selon la forme clinique.

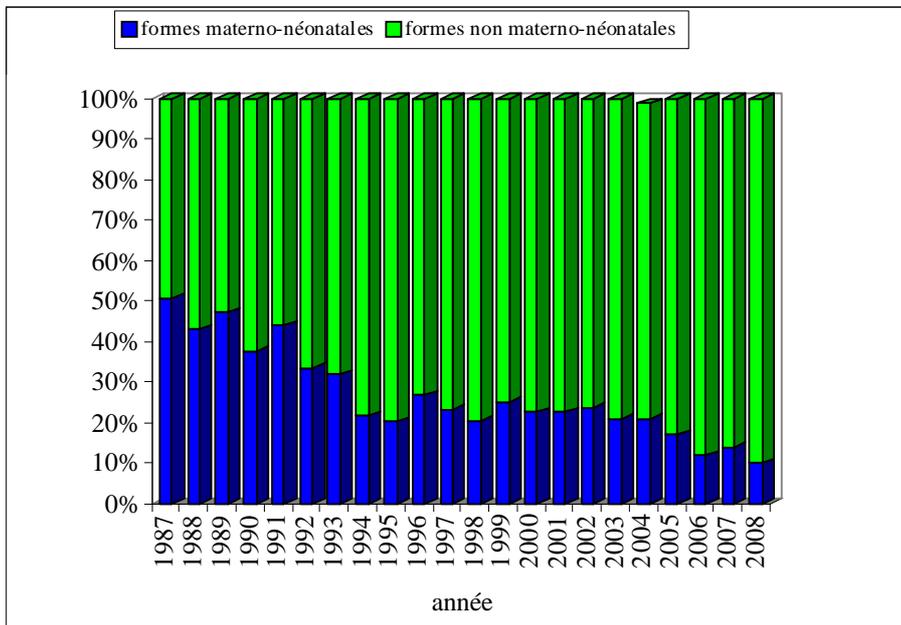


Figure 10 : Distribution mensuelle des cas sporadiques de listériose en France métropolitaine en 2008 selon la forme clinique.

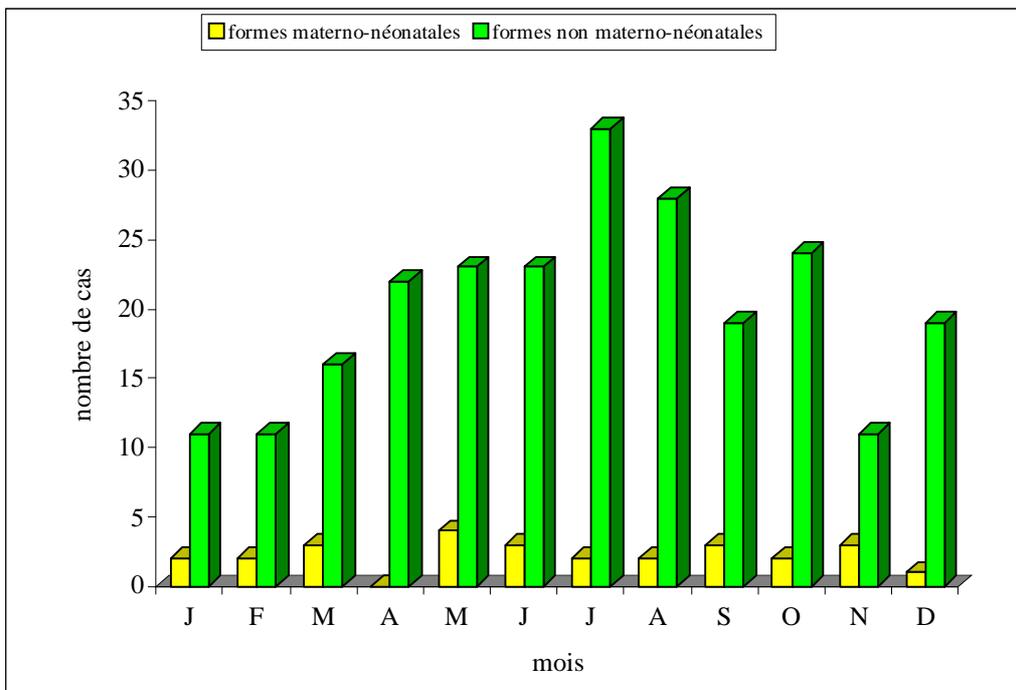


Figure 11 : Distribution des infections du système nerveux central et des septicémies pour les cas sporadiques de listériose en France métropolitaine depuis 1987.

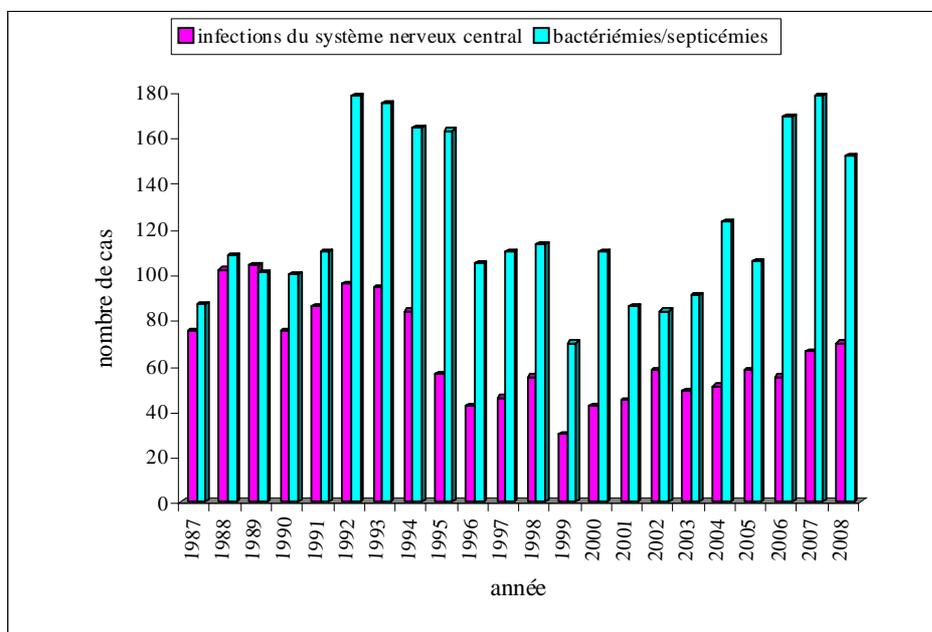
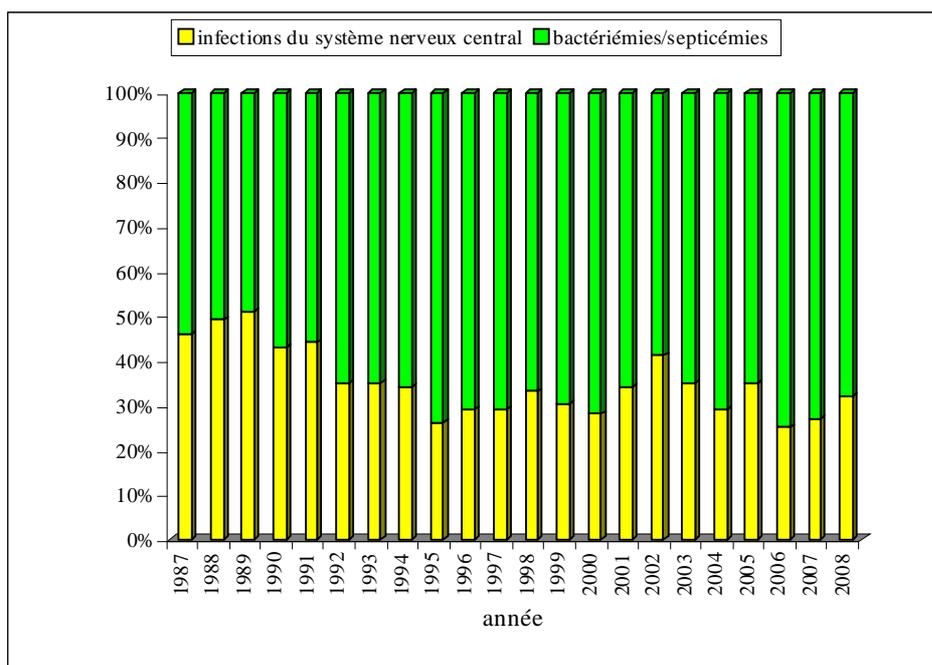


Figure 12 : Proportion des infections du système nerveux central et des septicémies pour les cas sporadiques de listériose en France métropolitaine depuis 1987.



Distribution régionale et temporelle

Les distributions régionale et temporelle sont présentées dans les tableaux 5 et 6 et les figures 9, 10 et 13.

Deux régions, la Haute-Normandie et la Provence-Alpes-Côte d'Azur, ont un nombre élevé de formes non-maternonatales en 2008 par rapport à 2007 (deux régions majoritaires : Ile de France et Rhône-Alpes).

D'un point de vue temporel, on peut observer la plus forte proportion d'autres formes durant le troisième trimestre de 2008 par rapport à 2007 et, pour le mois de Mars 2008, le nombre de cas d'infections du système nerveux central par rapport aux formes de septicémies.

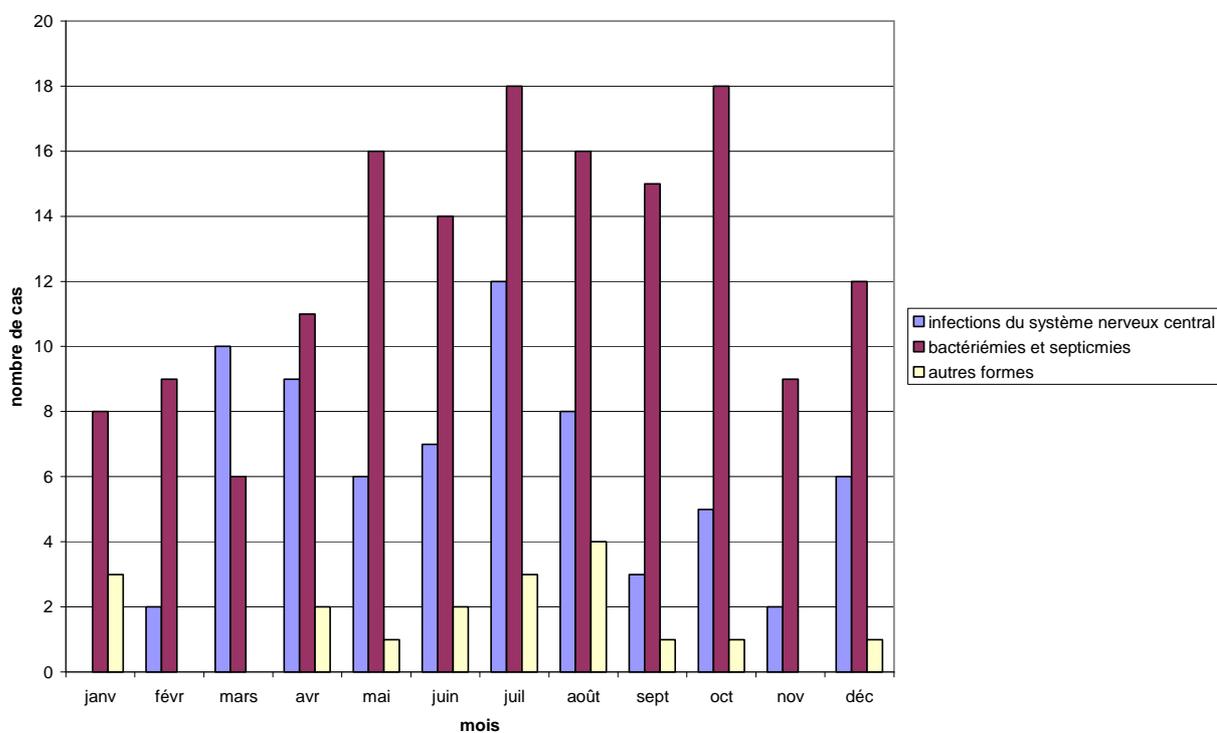
Tableau 5 : Distribution régionale des cas sporadiques de listériose en France Métropolitaine en 2008 selon la forme clinique.

Région	Total	Formes materno-néonatales	Formes non materno-néonatales
Alsace	12	2	10
Aquitaine	20	1	19
Auvergne	5	0	5
Basse-Normandie	5	0	5
Bourgogne	7	0	7
Bretagne	14	0	14
Centre	7	1	6
Champagne-Ardenne	7	0	7
Corse	0	0	0
Franche-Comté	1	0	1
Haute-Normandie	6	0	6
Ile-de-France	43	8	35
Languedoc-Roussillon	14	3	11
Limousin	2	1	1
Lorraine	8	0	8
Midi-Pyrénées	17	0	17
Nord-Pas-de-Calais	12	1	11
Pays de la Loire	11	1	10
Picardie	6	1	5
Poitou-Charentes	5	0	5
Provence-Alpes-Côte-D'azur	18	2	16
Rhône-Alpes	47	6	41
Total	267	27	240

Tableau 6 : Distribution mensuelle des formes sporadiques de listériose non materno-néonatale en France métropolitaine en 2008.

Mois	Infections du système nerveux central	Septicémies	Autres formes	Total
J	0	8	3	11
F	2	9	0	11
M	10	6	0	16
A	9	11	2	22
M	6	16	1	23
J	7	14	2	23
J	12	18	3	33
A	8	16	4	28
S	3	15	1	19
O	5	18	1	24
N	2	9	0	11
D	6	12	1	19
Total	70	152	18	240

Figure 13 : Distribution mensuelle des formes sporadiques de listériose non materno-néonatale en France métropolitaine en 2008.



Terrain

L'information sur l'existence ou non d'une affection sous-jacente ou concomitante était rapportée dans 241 cas (90 % contre 86% en 2007). Pour 125 patients (52% 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, 116 patients (48 %) 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. Le manque d'information provient du fait que ce sont les biologistes qui remplissent principalement les feuilles de renseignements du CNRL et non les prescripteurs-praticiens. Ils n'ont donc pas forcément connaissance des informations bien qu'une nouvelle feuille de renseignements établie en 2008 par le CNRL a facilité le remplissage de ce document.

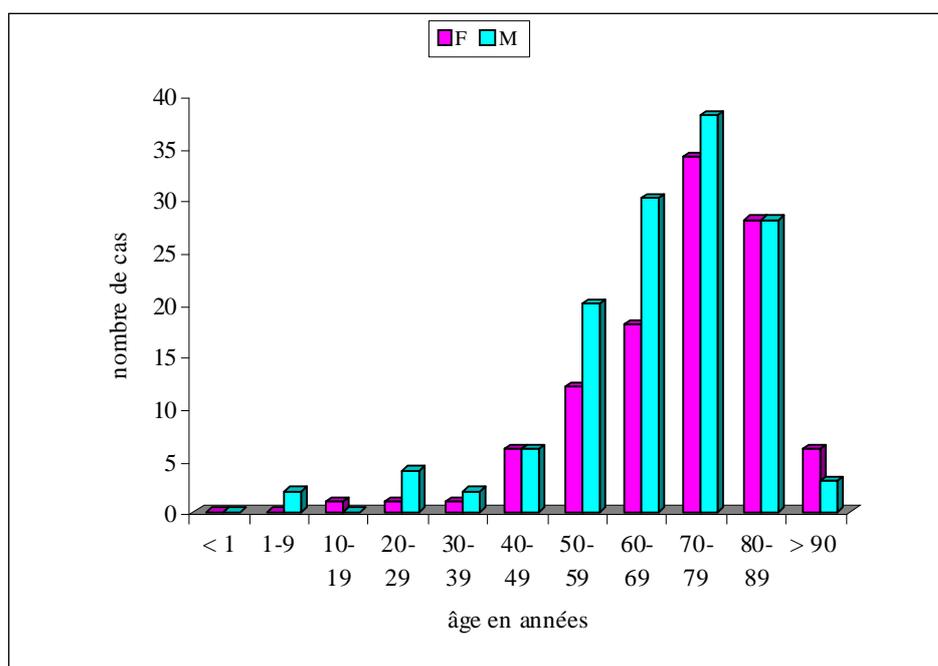
Age et sexe des patients avec listériose non materno-néonatale sporadique

L'âge moyen était de 69 ans [<1 à 97 ans] ce qui est comparable à 2007. Dans 185 cas (77 %), l'infection est survenue après 60 ans, dans 52 cas (22 %) entre 21 et 60 ans et dans 3 cas (1 %) avant 21 ans, tous sexes et formes cliniques confondus (figure 16). La population à risque pour les formes non-maternonéonatale reste toujours les personnes de plus de 60 ans, voire même de plus de 70 ans. Le sexe ratio M/F était de 1,3 en 2008 contre 1,6 en 2007. Cette relative prédominance de la listériose chez l'homme s'observe quelle que soit la forme clinique et est à ce jour inexplicée (Tableau 7 et Figure 14). Pour les personnes âgées de plus de 60 ans, on note une prédominance des cas masculins et pour les personnes âgées de plus de 90 ans, on note une prédominance de cas féminins (6 cas contre 3), probablement attribuable à l'espérance de vie plus élevée des femmes. Le nombre d'infections du système nerveux central varie de 0 à 75 % de tous les cas de listériose non materno-néonatale selon la classe d'âge (classes de 10 ans) et le sexe des patients alors que les septicémies varient quant à elles de 0 à 100 % selon ces mêmes critères.

Tableau 7 : Distribution par classe d'âge, par sexe et par forme clinique des formes non materno-néonatales sporadiques en France métropolitaine en 2008.

Sexe	Classe d'âge	Total	Infections du système nerveux central		
			Septicémies	Autres formes	
F	> 28 jours-20 ans	1	0	1	0
	21-60 ans	20	7	13	0
	> 60 ans	86	24	56	6
M	> 28 jours-20 ans	2	1	1	0
	21-60 ans	32	13	15	4
	> 60 ans	99	25	66	8
Total	> 28 jours-20 ans	3	1	2	0
	21-60 ans	52	20	28	4
	> 60 ans	185	49	122	14

Figure 14 : Distribution par classe d'âge et par sexe des formes sporadiques de listériose non materno-néonatale en France métropolitaine en 2008.



3.1.3.4 DISTRIBUTION DES SOUCHES SELON LE GROUPE PCR

Analyse générale

Les résultats obtenus pour les 267 souches d'origine humaine de France métropolitaine sont les suivants :

- groupe PCR IIa (souches de sérovar 1/2a ou 3a) : 89 souches (33 %),
- groupe PCR IIb (souches de sérovar 1/2b, 3b ou 7) : 27 souches (10 %),
- groupe PCR IIc (souches de sérovar 1/2c ou 3c) : 11 souches (4 %),
- groupe PCR IVb (souches de sérovar 4b, 4d ou 4e) : 140 souches (53 %),
- groupe PCR L (souches de sérovares 4ab, 4c, 7) : 0 souche (0 %)
- groupe PCR nouveau (sérovar 4b) 0 souches (0 %)

Par rapport à l'année 2007, le CNRL n'a pas identifié de nouveau profil de groupe PCR pour les souches d'origine humaine.

Si les distributions parmi les 4 groupes PCR restent à peu près inchangées, il est intéressant de souligner un nombre croissant de souches du groupe PCR IVb depuis 2006 (Figure 15) et l'augmentation continue des souches de groupe PCR IIc classiquement rarement associées à des cas humains n'a pas été constatée en 2008. Cependant, comme le montre la figure 19, le groupe PCR IVb semble globalement en augmentation progressive depuis 1992. D'après B. Swaminathan et P. Gerner-Smidt (2007), de nombreux pays ont observé une inversion des sérovares causant les infections humaines du sérovar 4b aux sérovares 1/2a et 1/2b qui accompagnent la montée des formes septicémiques par rapport aux formes neuroméningées. En France, cette tendance n'est donc pas confirmée.

Pour 2008, l'ensemble des signalements a été associé à des souches du groupe PCR IVb, ce qui est différent de ce qui a été constaté depuis 2005, où les signalements concernaient différents sérogroupes (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 16).

Distribution régionale des groupes PCR

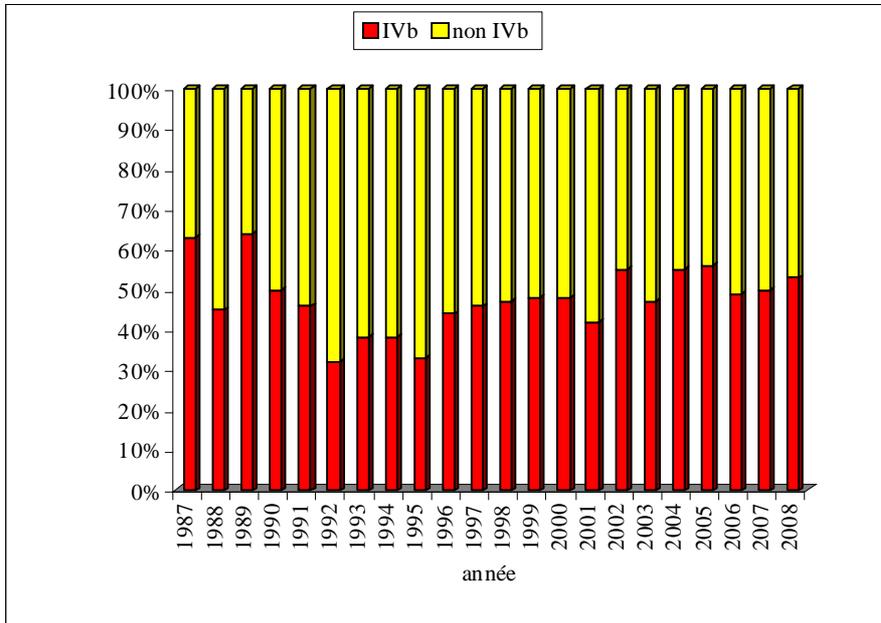
La distribution régionale des souches par groupe PCR (Tableau 8) ne permet pas de mettre en évidence de distribution particulière pour un groupe de souches donné, notamment en raison de faibles effectifs considérés.

Il n'y a donc toujours pas de rapport prouvé entre les groupes PCR et l'origine géographique et comme nous le verrons ultérieurement avec l'animal ou l'aliment ou l'environnement d'origine de la souche.

Tableau 8 : Distribution régionale des cas sporadiques de listériose en France métropolitaine en 2008 selon les groupes PCR

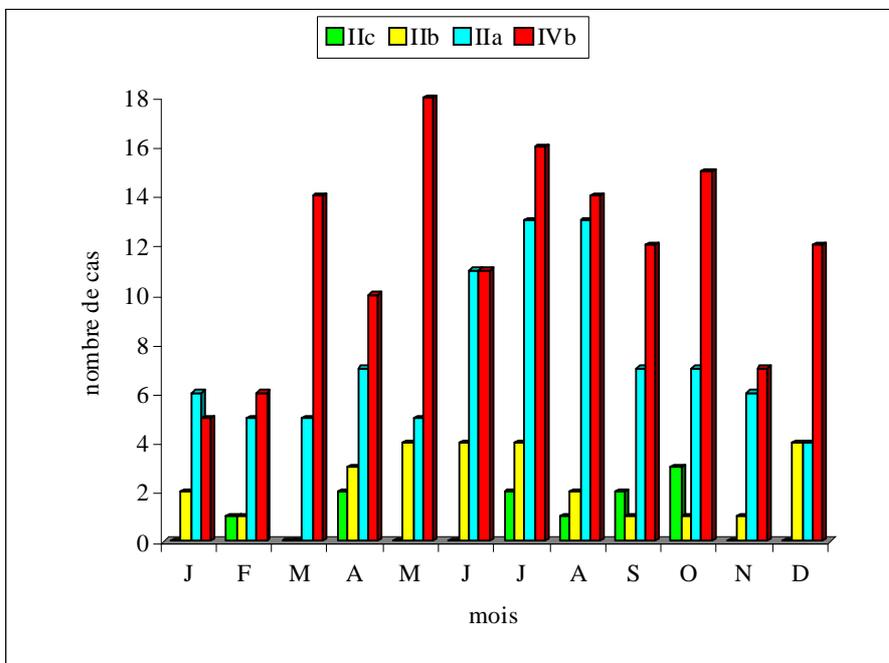
Région	Total	IIa	IIb	IIc	IVb	L	Nouveau
Alsace	12	1	1	0	10	0	0
Aquitaine	20	1	3	2	14	0	0
Auvergne	5	1	1	1	2	0	0
Basse-Normandie	5	2	0	0	3	0	0
Bourgogne	7	2	1	0	4	0	0
Bretagne	14	5	2	1	6	0	0
Centre	7	2	0	0	5	0	0
Champagne-Ardenne	7	2	0	0	5	0	0
Corse	0	0	0	0	0	0	0
Franche-Comté	1	1	0	0	0	0	0
Haute-Normandie	6	1	1	1	3	0	0
Ile-de-France	43	13	6	2	22	0	0
Languedoc-Roussillon	14	7	2	0	5	0	0
Limousin	2	0	0	0	2	0	0
Lorraine	8	3	1	2	2	0	0
Midi-Pyrénées	17	7	0	0	10	0	0
Nord-Pas-de-Calais	12	4	0	0	8	0	0
Pays de la Loire	11	6	3	0	2	0	0
Picardie	6	0	0	1	5	0	0
Poitou-Charentes	5	1	1	0	3	0	0
Provence-Alpes-Côte-D'azur	18	7	4	0	7	0	0
Rhône-Alpes	47	23	1	1	22	0	0
Total	267	89	27	11	140	0	0

Figure 15: Distribution annuelle des souches de *L. monocytogenes* groupe PCR IVb (souches de sérovars 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 16: Distribution mensuelle des souches de *L. monocytogenes* des 4 principaux groupes PCR responsables de cas sporadiques de listériose en France métropolitaine en 2008.



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 (89%) et les infections du système nerveux central (64%) (Tableau 8). La proportion de souches par groupe PCR est environ celle de 2007 pour les formes non-materno-néonatales. Pour les septicémies, les deux groupes majeurs PCR IIa (40%) et IVb (41%) sont en proportion équivalente. Pour les formes materno-néonatales, les groupes PCR non IVb (= IIa) sont en nette diminution, à 11% contre 32 % en 2007.

En 2008, le groupe PCR IIc plus rare a été principalement associé des septicémies, et dans un cas d'infection du système nerveux central et un cas de contamination d'un liquide articulaire du genou. En 2007, le groupe PCR IIc avait été exclusivement associé à des septicémies, ainsi qu'à une forme materno-néonatale et un cas d'une infection de prothèse de hanche. En revanche, le groupe PCR IIc n'avait été associé à aucune infection du système nerveux central contrairement à 2006.

Formes materno-néonatales

Les 27 souches à l'origine des formes materno-néonatales se répartissent comme suit :

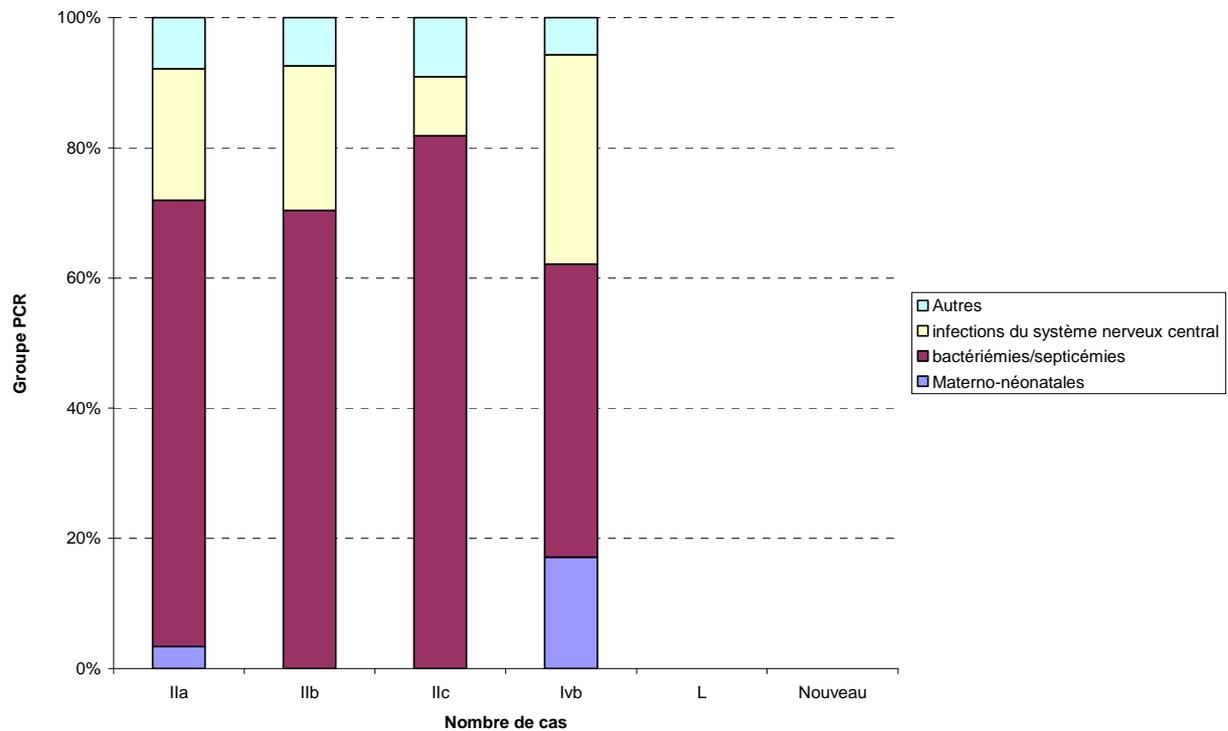
- groupe PCR IIa (souches de sérovar 1/2a ou 3a) : 3 souches (11 %),
- groupe PCR IIb (souches de sérovar 1/2b ou 3b ou 7) : 0 souche (0 %),
- groupe PCR IIc (souches de sérovar 1/2c ou 3c) : 0 souche (0 %),
- groupe PCR IVb (souches de sérovar 4b ou 4d ou 4e) : 24 souches (89 %),
- groupe PCR L (souches de sérovar 4ab, 4c, 7) : 0 souche (0 %),
- groupe PCR nouveau (sérovar 4b) : 0 souche (0 %).

Formes non materno-néonatales

Les 240 souches à l'origine des formes non materno-néonatales se répartissent comme suit :

- groupe PCR IIa (souches de sérovar 1/2a ou 3a) : 86 souches (36 %),
- groupe PCR IIb (souches de sérovar 1/2b ou 3b ou 7) : 27 souches (11 %),
- groupe PCR IIc (souche de sérovar 1/2c ou 3c) : 11 souches (5 %),
- groupe PCR IVb (souches de sérovar 4b ou 4d ou 4e) : 116 souches (48 %),
- groupe PCR L (souches de sérovar 4ab, 4c, 7) : 0 souche (0 %),
- groupe PCR nouveau (Sérovar 4b) : 0 souche (0 %).

Figure 17 : Distribution des groupes PCR des souches de *L. monocytogenes* en fonction des formes cliniques en France métropolitaine en 2008.



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 9). Les souches du groupe PCR IVb sont prédominantes quelle que soit la forme clinique (Tableau 10 et Figure 17) et ces souches sont plus fréquemment associées à des formes materno-néonatales et des infections du système nerveux central. Les souches des groupes PCR IIa, IIb, IIc sont en proportion plus associées aux formes bactériémiques que les autres formes, comme en 2007. Une hypothèse pouvant expliquer cette répartition pourrait être la plus faible proportion d'expression d'InIA tronquées dans le génogroupe PCR IVb et le rôle d'InIA dans la traversée des barrières de l'hôte.

Tableau 9 : 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 2008.

Sexe	Classe d'âge	Total	Groupe PCR					
			IIa	IIb	IIc	IVb	L	Nouveau
F	> 28 jours-20 ans	1	0	0	1	0	0	0
	21-60 ans	20	9	2	1	8	0	0
	> 60 ans	86	30	9	5	42	0	0
M	> 28 jours-20 ans	2	1	0	0	1	0	0
	21-60 ans	32	12	3	0	17	0	0
	> 60 ans	99	34	13	4	48	0	0
Total	> 28 jours-20 ans	3	1	0	1	1	0	0
	21-60 ans	52	21	5	1	25	0	0
	> 60 ans	185	64	22	9	90	0	0

Tableau 10 : 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 2008.

Forme clinique	Groupe PCR						
	Total	IIa	IIb	IIc	IVb	L	Nouveau
Materno-néonatales	27	3 (3)	0 (0)	0 (0)	24 (17)	0 (0)	0 (0)
Septicémies	152	61 (69)	19 (70)	9 (82)	63 (45)	0 (0)	0 (0)
Infections du système nerveux central	70	18 (20)	6 (22)	1 (9)	45 (32)	0 (0)	0 (0)
Autres	18	7 (8)	2 (8)	1 (9)	8 (6)	0 (0)	0 (0)
Total	267	89	27	11	140	0 (0)	0 (0)

3.1.4 CAS DE LISTERIOSE DANS LES DOM-TOM

En 2008, 5 cas sporadiques de listériose (contre 7 cas en 2007) ont été notifiés pour des patients résidant dans les DOM-TOM et se répartissent de la façon suivante (Tableau 11) :

Tableau 11 : Distribution par forme clinique et groupe PCR des souches de *L. monocytogenes* isolées des cas provenant des DOM-TOM en 2008.

DOM/TOM Formes cliniques	Nombre	Groupe PCR			
		IIa	IIb	IIc	IVb
Martinique					
Infections du système nerveux central	1				1
Septicémies	2	1	1		
Ile de la réunion					
Autres formes (ponction cardiaque)	1	1			
Infections du système nerveux central	1				1
TOTAL	5	2	1	0	2

La répartition relative par séro-groupe PCR représente les principaux groupes PCR retrouvés pour ces cas cliniques avec une prépondérance du groupe PCR IIa par rapport à 2007.

La répartition des formes cliniques est la suivante :

- formes materno-néonatales : 0% (contre 29 % en 2007)
- infections du système nerveux central : 60% (contre 29 % en 2007)
- septicémies : 40% (contre 42 % en 2007)

Cette répartition diffère de celle de 2007 et de 2006 par un abaissement du nombre de formes materno-néonatales et une augmentation des infections du système nerveux central mais ces effectifs sont trop faibles pour en tirer des conclusions.

3.1.5 ETUDE DE LA RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES

L'étude de la résistance aux antibiotiques des souches de *L. monocytogenes* d'origine humaine au moyen de la méthode par disque a été réalisée en parallèle de leur caractérisation de façon prospective, tout au long de l'année 2008 (cf. chapitre 2.1.). Chaque souche présentant un profil inhabituel ou de sensibilité diminuée a été adressée au CNR de la résistance aux antibiotiques (Institut Pasteur) pour confirmation et détermination du mécanisme de résistance.

Toutes les souches étaient sensibles à la pénicilline, à l'ampicilline, à l'amoxicilline, à l'imipénème et à la gentamicine. Le traitement de référence de la listériose (Amoxicilline/Ampicilline + Gentamicine) n'est donc pas remis en question par la présence de souches résistantes. Cependant, deux souches en 2008 provenant d'une forme neuroméningée et d'une infection de prothèse de hanche présentent une résistance au triméthoprim dont le mécanisme de résistance est en cours d'étude, alors qu'elles étaient sensibles à l'ampicilline, à l'amoxicilline et à la gentamicine. La notion de traitement antérieur par Triméthoprim-

sulfaméthoxazole chez ce patient n'est pas connue. Le traitement alternatif (Triméthoprim-sulfaméthoxazole) au traitement de référence en cas d'allergie pourrait donc être mis en échec, bien qu'il s'agisse de tests *in vitro* qui ne corrèlent pas nécessairement avec ce qui peut être observé *in vivo*, d'où l'importance de rechercher des traitements alternatifs pour les patients allergiques à l'ampicilline et à l'amoxicilline. Dans ce but, le CNRL a validé *in vivo* et *in vitro* (échantillonnage de souches du CNRL) le traitement alternatif à base de moxifloxacine. En 2008, une souche humaine présente une résistance faible à la levofloxacine et la moxifloxacine, dont le mécanisme de résistance est en cours d'étude. Cependant, la moxifloxacine, si elle était utilisée, devrait l'être avec prudence, non seulement car son intérêt au cours de la listériose humaine n'est pas prouvé, mais aussi du fait de la restriction récente d'AMM en raison de cas d'hépatites graves.

Toutes les souches étaient sensibles à la rifampicine, érythromycine, linézolid, acide fuschnique, vancomycine. En revanche, 4 souches montraient une résistance à la tétracycline (1 cas de septicémie), au chloramphénicol (1 cas de septicémie) et à la ciprofloxacine (2 cas : une infection de prothèse de hanche et une forme neuroméningée). Une souche provenant d'une infection de prothèse de hanche montrait une double résistance à la ciprofloxacine et au triméthoprim. Le mécanisme de résistance de ces souches est en cours d'étude. L'utilisation de quinolones et/ou de Bactrim® au cours du traitement de ces infections n'est pas documentée.

Toutes les souches montraient comme attendu une résistance naturelle *in vitro* à la céfotaxime, à la clindamycine, aux sulfonamides, à la fosfomycine et à l'acide nalidixique et une sensibilité à la kanamycine et la streptomycine à l'exception de 11 souches qui étaient sensibles à l'une ou l'autre de ces antibiotiques, et 4 souches sensibles à 2 d'entre eux. Ces souches sont en cours d'étude par le CNR de la résistance aux antibiotiques.

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 de la listériose quelle que soit sa forme. Par ailleurs, la présence de 2 souches résistantes au triméthoprim au cours de l'année 2008 démontre l'utilité de poursuivre la recherche d'alternatives thérapeutiques en cas d'échec ou d'intolérance aux β -lactamines. Il convient de surveiller attentivement l'émergence éventuelle de telles souches résistantes.

3.1.6 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'une troisième enzyme de restriction *SmaI* permet d'affiner la comparaison des souches comme il a été précisé dans le chapitre 2.1.1. En 2008, cette troisième enzyme a du être utilisée fréquemment, ce qui représente un surcoût substantiel.

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 CNRL 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 partiellement la surveillance effectuée à l'œil qui était devenue difficilement gérable.

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 concerne donc pas 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 (DGCCRF), 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 caractérisation au CNRL. Dans ce cas, ces professionnels peuvent choisir de les expédier soit au CNRL soit au Laboratoire National de Référence de *Listeria monocytogenes* (LNRI) de l'AFSSA à Maisons-Alfort. En outre, le LNRI est destinataire des souches des plans annuels de surveillance et de contrôle *Listeria monocytogenes* qui permettent d'estimer la contamination d'aliments de différentes filières pour la DGAL.

3.2.1 ANALYSE GENERALE

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.

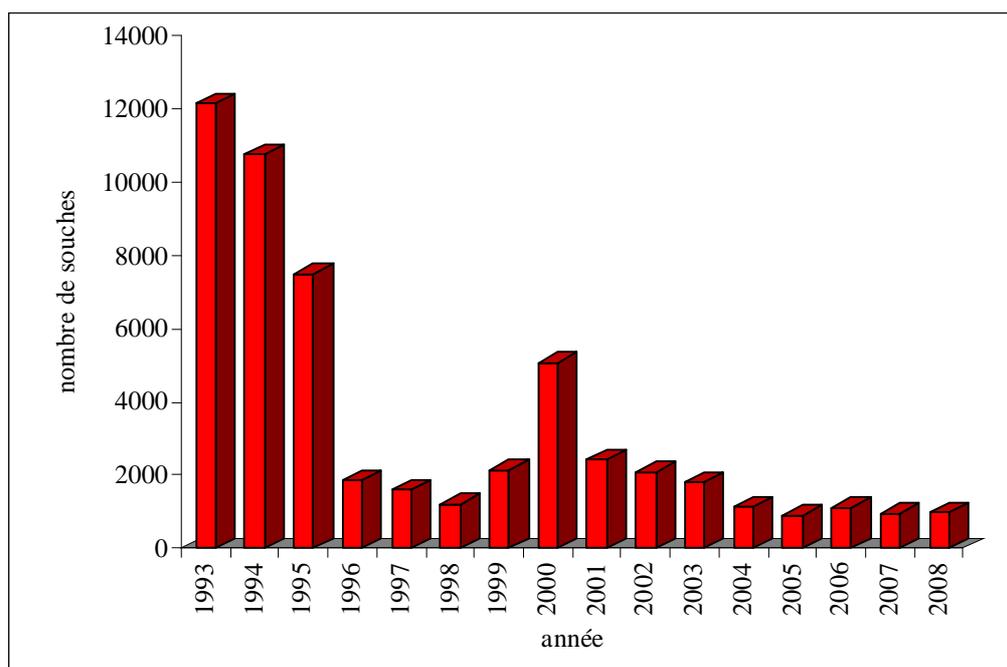
En 2008, 988 souches d'origine non humaine ont été adressées au CNRL par des laboratoires français, soit une augmentation de 4% par rapport à 2007 (Figure 18). Ce nombre reste cependant faible en raison de l'existence de destinataires multiples pour ce type de souches

(LNRI ou autres laboratoires spécialisés). Une réflexion sur le dispositif actuel est probablement nécessaire pour rationaliser cette organisation.

Le CNRL a reçu des souches alimentaires dans le cadre de deux contre-expertises diligentées par des assureurs afin de procéder, au vu de la confirmation de l'identification de ces souches par le CNRL aux remboursements nécessaires des producteurs agroalimentaires.

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, comme en 2007, 97% des souches envoyées correspondaient 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.

Figure 18: Nombre annuel de souches d'origine non-humaine adressées par des laboratoires français depuis 1993.



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

- Laboratoires Vétérinaires Départementaux (LVD) : 443 souches (45 %),
- Laboratoires privés d'hygiène alimentaire : 475 souches (48 %),
- Laboratoires Interrégionaux de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes : 67 souches (7 %),
- Laboratoires hospitaliers d'hygiène : 3 souches (<1 %).

L'origine des souches était la suivante :

- souches isolées d'aliments : 860 souches (87 %),
- souches isolées de l'environnement : 107 souches (11 %),
- souches sans information : 10 souches (1 %),
- souches isolées chez l'animal : 11 souches (1 %).

Les souches sans information sont des souches réceptionnées de laboratoires d'analyses privés pour caractérisation des souches. Cette expertise est alors facturée au laboratoire demandeur. Cependant, le CNRL fait rentrer les données de caractérisation dans la surveillance nationale. En cas de problème de santé publique pouvant être relié à ces souches, le CNRL se réserve le droit, après en avoir informé son client, de demander un complément d'informations sur les souches qui seront transmises le cas échéant aux autorités sanitaires.

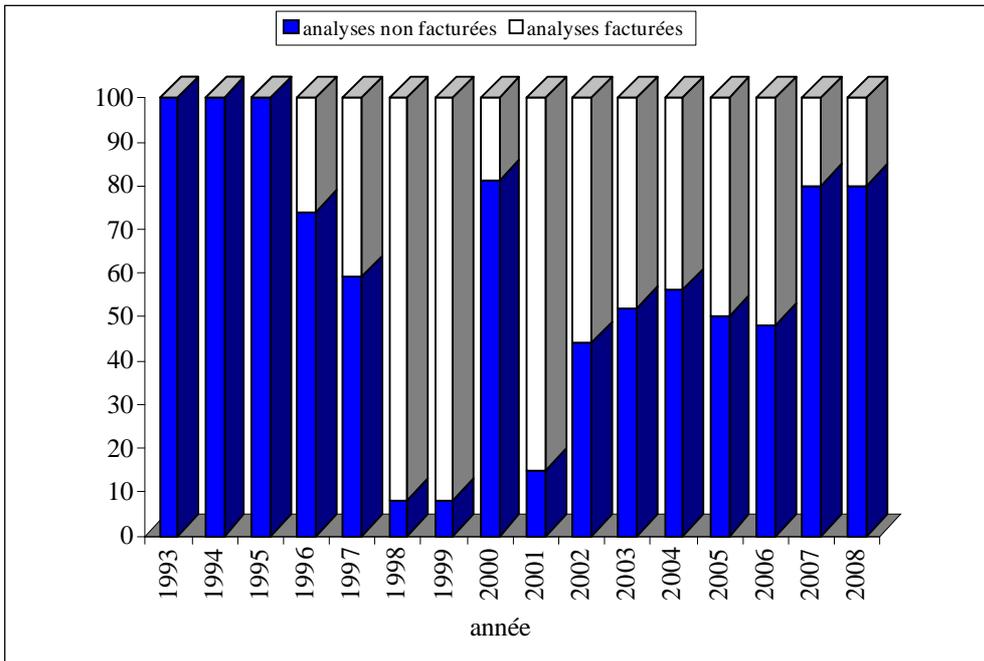
Une souche alimentaire a été adressée dans le cadre de travaux de recherche correspondant à une souche à croissance lente donnant des colonies atypiques sur les milieux chromogéniques de routine pour vérification de ses caractéristiques et du fait d'une étude précédente du même type effectuée au CNRL (Leclercq et coll., 2004).

Trois souches vétérinaires en 2008 ont été incluses dans un signalement (L08/07: signalement correspondant à une souche isolée d'un cas de méningite humaine, de deux avortements dans des troupeaux de bovins de production laitière) ce qui démontre l'importance de collecter ces souches afin de pouvoir maximiser les chances d'identifier l'amorce d'une contamination de la chaîne alimentaire et ainsi la maîtriser.

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 neuroméningées, alertes DGAI). Ces analyses sont prises en charge par le CNRL dans le cadre d'un accord entre le CNRL, la DGAI, l'InVS et la DGCCRF.

➔ En 2008, 20 % des essais ont fait l'objet d'une facturation (comme en 2007) (Figure 19).

Figure 19 : 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 860 souches isolées d'aliments, selon la catégorie de laboratoires, était la suivante :

- Laboratoires Vétérinaires Départementaux (LVD) : 416 souches (48 %),
- Laboratoires privés d'hygiène alimentaire : 374 souches (43 %),
- Laboratoires Interrégionaux de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes : 67 souches (8 %),
- Laboratoires hospitaliers d'hygiène : 3 souches (1 %).

→ En 2007, le nombre de souches a augmenté de +9,3% par rapport au nombre de 2006 (787 souches). Cette augmentation s'explique par les démarches d'information du CNRL, et l'accroissement des contrôles et autocontrôles dans le domaine agro-alimentaire suite à l'augmentation des cas de listériose ces dernières années. Cependant, au regard du nombre d'analyses de recherche et de dénombrement de *L. monocytogenes* en agriculture et pour

l'environnement, ce nombre de souches n'est pas très élevé. Ceci peut s'expliquer par :

- La multiplicité des acteurs avec la mise en place récente du LNRI et la présence d'autres laboratoires spécialisés qui peut conduire à un effet de dilution, voire à des erreurs de destinataires selon le type de souches concernées.
- La non-obligation, sauf en cas de dépassements de seuils réglementaires, dans les méthodes d'analyse d'envoyer les souches à un centre/laboratoire de référence pour *L. monocytogenes* alors qu'il l'est pour *Salmonella*.
- La facturation de leur caractérisation 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;
- 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 2008, 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. Un article (Le Monnier, A., and A. Leclercq. 2009. *Listeria* et listériose: De la ferme à la fourchette. *Pathol Biol (Paris)* 57:17-22.) en français a été publié pour expliquer la surveillance de la listériose en France ainsi que ses résultats, et un article (Goulet, V., Leclercq, A., Vaillant, V., Le Monnier, A., Laurent, E., Thierry-Bled, F., Pihier, N., et H. de Valk. Recrudescence récente des cas de listériose en France. *Bull. Epidemiol. Hebdom.*, 2008, 268-272) a été publié sous l'égide de l'InVS qui présente un résumé de la situation sur l'augmentation des cas de listérioses en France et comporte une synthèse sur les alertes produits.

→ En 2008, le CNRL a reçu de nombreux appels téléphoniques et courriels d'hygiénistes hospitaliers ou de Directeur d'hôpitaux concernant le risque alimentaire lié à *Listeria monocytogenes*. La principale question était centrée sur la procédure à suivre face à un produit alimentaire non conforme pour *Listeria monocytogenes* en milieu hospitalier.

3.2.2.2 NOMBRE DE SOUCHES ET DISTRIBUTION PAR ESPECE

852 des 860 souches ont été identifiées. Les analyses sur 8 souches n'ont pas pu être effectuées pour les raisons suivantes : tubes de transport cassés (1) et souche non *Listeria* (7).

La répartition par espèce des 852 souches de *Listeria* était la suivante :

- *L. monocytogenes* : 842 souches (99 %),
- *L. ivanovii* : 2 souches (<1 %),
- *L. innocua* : 6 souches (<1 %),
- *L. welshimeri* : 2 souches (<1 %).

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 (<1 % des souches).

Dans le domaine alimentaire, ceci peut s'expliquer par l'utilisation croissante et normative de géloses chromogéniques de détection et de confirmation 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'ALIMENTS

L'origine des 842 souches de *L. monocytogenes* selon la catégorie d'aliment, était la suivante :

- viande et produits carnés : 298 souches (36 %),
- lait et produits laitiers : 406 souches (48 %),
- produits de la pêche : 86 souches (10 %),
- végétaux : 3 souches (<1%)
- autres aliments : 38 souches (5%),
- origine non précisée : 11 souches (1 %).

Les autres aliments sont de type plats cuisinés et pâtisseries. 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.

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

La répartition des souches par groupe PCR et par catégorie d'aliments est présentée dans le tableau 16. Les groupes PCR IIa (sérovars 1/2a, 3a), IIb (sérovars 1/2b, 3b, et 7), et IIc (sérovars 1/2c, 3c) représentent 80 % (contre 83% en 2007) des souches isolées, et sont majoritaires dans chaque catégorie d'aliment. Le groupe PCR IVb (sérovars 4b, 4d et 4e), pourtant le plus

fréquemment à l'origine des cas de listériose humaine, correspond quant à lui à seulement 19 % (contre 16% en 2009) des souches isolées des aliments. On peut donc détecter une légère augmentation du nombre de souches du groupe PCR IVb pour ces deux dernières années au détriment du groupe PCR II (IIa, IIb, IIc), ce qui est à surveiller.

Il est rapporté dans la littérature que le groupe PCR IVb est de virulence accrue bien que les bases moléculaires de cette relative hypervirulence ne sont pas encore clairement établies. Cette virulence accrue pourrait notamment être expliquée par l'internaline A ou/et la listeriolysine S.

L'internaline A (InIA), une protéine permettant l'internalisation de *Listeria* dans les cellules et la traversée des barrières intestinale et placentaire si elle est exprimée en surface de la bactérie, comme c'est le cas chez les souches de sérovars 4b et 1/2b, alors que ce n'est pas le cas pour les souches des sérovars 1/2c et à un moindre degré 1/2a (Jacquet et coll., 2004, Lecuit et coll. 2004, Lecuit et coll. 2001, Disson et coll. 2008). La listeriolysine S, un facteur cytotoxique et hémolytique, encodée par l'îlot de pathogénicité LIPI-3 (*Listeria* Pathogenicity Island-3) est présent uniquement dans les souches de la lignée I comprenant les sérovars 4b et 1/2b principalement associés aux cas humains sporadiques et aux épidémies de listériose (Cotter et coll., 2008). Ceci pourrait également rendre compte de la virulence accrue des sérovars 4b et 1/2b.

Le groupe PCR IIa reste majoritaire pour les souches d'origine alimentaire comme pour les produits carnés, laitiers ou issues de la pêche. Il est suivi ensuite du groupe PCR IVb comme pour les produits carnés et laitiers (Tableau 15).

Tableau 15 : Distribution par groupe PCR et par catégorie d'aliments des 842 souches de *L. monocytogenes* reçues en 2008 de laboratoires français.

Groupe PCR	viande et produits carnés	lait et produits laitiers	produits de la pêche	végétaux	autres aliments	origine non précisée	Total
IIa	168	211	70	1	19	4	473 (56%)
IIb	47	89	7	1	6	3	153 (18%)
IIc	34	3	8	0	6	1	52 (6%)
IVb	49	103	1	1	7	3	164 (20%)
Total	298 (36%)	406 (48%)	86 (10%)	3 (<1%)	38 (5%)	11 (1%)	842

3.2.3 SOUCHES ISOLEES DE L'ENVIRONNEMENT

En 2008, 107 souches provenant de l'environnement ont été reçues au CNRL, adressées par les Laboratoires Vétérinaires Départementaux [57 (53 %)] et des laboratoires privés [50 (46 %)]. Il s'agit d'une augmentation de +7 % de souches provenant de l'environnement par rapport à l'année 2007. Cette augmentation peut provenir de la bonne application de l'article 5 du

règlement européen EC 2073/2005 (et EC 1441/2007) sur les prélèvements de surface. Cependant, il est à noter qu'aucun prélèvement provenant du milieu hospitalier n'a été reçu en 2008 alors que des contaminations dans des cuisines hospitalières ont été rapportées au CNRL pour avis sur les suites à donner. Une sensibilisation par les autorités sanitaires sur ce point nous apparaît utile.

Il s'agissait dans 104 cas (97 %) de souches de *L. monocytogenes* et dans 3 cas (3 %) de souches de *L. innocua*.

La répartition par groupe PCR des 104 souches de *L. monocytogenes* est la suivante :

- groupe PCR IIa (sérovars 1/2a et 3a) : 57 souches (55 %),
- groupe PCR IIb (sérovars 1/2b, 3b et 7) : 17 souches (16 %),
- groupe PCR IIc (sérovars 1/2c et 3c) : 13 souches (13 %),
- groupe PCR IVb (sérovars 4b, 4d et 4e) : 17 souches (16 %),
- groupe PCR L (sérovars 4a, 4ab et 4c) : 0 souches (0 %)

Comme pour les souches isolées d'aliments, les souches des groupes PCR IIa, IIb et IIc sont majoritaires, soit 84 % (comme en 2007) des souches de *L. monocytogenes* isolées de l'environnement.

En 2008, 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) afin d'effectuer des études phylogénétiques, de virulence, d'acquisition/sélection de gènes, etc.

➔ La surveillance dans l'environnement naturel (eau, sol, ensilage, terre, etc.) des *Listeria monocytogenes* n'est donc plus effectuée alors que l'environnement naturel est la base de la contamination de la chaîne alimentaire par *L. monocytogenes* et de la diversité des souches. Des réponses aux questions posées par l'augmentation des cas de listérioses depuis 2005 pourraient y être décelées. Bien que la surveillance des cas de listérioses animales ou de leur contamination par *L. monocytogenes* ou *L. ivanovii* soit réalisée en France localement par les laboratoires départementaux vétérinaires, ces souches vétérinaires ne sont pas centralisées au CNRL, et un bilan national est donc difficile à établir. Le CNRL en 2008 a aidé les demandeurs de ce secteur à établir des méthodes (Détection de *L. monocytogenes* dans l'eau, dans la terre), les a sensibilisés à l'intérêt de remonter les souches vers les centres/laboratoires de référence et de confirmer leurs identifications.

3.3 BILAN DES INVESTIGATIONS, SIGNALEMENTS ET ALERTES

3.3.1 SUSPICIONS D'INFECTIONS NOSOCOMIALES

À quatre reprises en 2008, le diagnostic de plusieurs cas de listériose groupés temporellement et géographiquement (même hôpital, voire même service) ont fait suspecter une contamination nosocomiale sans qu'en aucun cas cela puisse être prouvé puisque les souches d'une même origine hospitalière avaient des profils PFGE différents.

Dans un hôpital en 2008, le personnel avait consommé du jambon faisant l'objet d'un dépassement des seuils réglementaires sans qu'aucun cas connu chez le personnel ou les patients ne soit constaté.

3.3.2 SIGNALEMENTS

En 2008, 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 modifiée 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 2008 fera référence aux 2 nomenclatures (Tableau 16).

En 2008, le CNRL a effectué 9 signalements (contre 16 en 2007) pour des souches exclusivement de séro groupe PCR IVb alors qu'en 2007 les sérogroupe IIa, IIb et IVb étaient représentés. Cette exclusivité en 2008 des signalements concernant le groupe PCR IVb réputé le plus virulent et à l'origine de nombreuses épidémies est à surveiller. Il s'agit du nombre le plus faible de signalements depuis l'année 2002 sachant par ailleurs que depuis août 2006 les critères de signalement avaient été optimisés pour diminuer des investigations lourdes parfois inutiles (Cf. Chapitre 5.1.1.). Trois signalements effectués en 2007 ont concerné des cas diagnostiqués en 2008 et ont été clos en 2008. Un signalement (L08/07) a été clôturé en 2009. Tous les autres signalements de 2008 ont été clôturés en 2008.

Tableau 16 : Signalements de listériose, signalement associé à des cas associés et des cas sporadiques, France, 2000-2008 (modifié de Goulet et coll., 2008)

Caractéristiques	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008
Nombre de signalements détectés	9	4	10	11	13	11	11	16	9
Nombre de cas appartenant à un signalement	53	21	70	78	88	65	98	106	58
Nombre de cas n'appartenant pas à un signalement	210	167	150	131	148	156	192	213	214

3.3.3 ALERTES DGAL

Il s'agit d'identifier les cas causés par 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 2008, un changement a été effectué en cours d'année, en ne remontant pour effectuer les rapports à la cellule *Listeria* que sur trois mois au lieu de six mois pour les souches humaines présentant les mêmes caractéristiques que celles isolées de produits alimentaires contaminés par *L. monocytogenes*. Ce changement a été motivé par l'observation que la période d'incubation maximale est de 70 jours.

→ En 2008, 652 souches (contre 513 en 2007 soit +27% d'augmentation) ont été adressées au CNRL dans le cadre des 280 (contre 198 en 2007 soit +29% d'augmentation) alertes produits déclenchées par la DGAL (contre 200 alertes produits en 2006).

Ces 280 alertes produits se décomposaient en :

- 216 alertes suite à un autocontrôle ;
- 40 alertes suite à un contrôle officiel ;
- 18 alertes suite à un contrôle officiel d'autres administrations (DGCCRF) ;
- 1 alerte suite à une plainte de consommateur ;
- 1 alerte suite à un contrôle aux frontières ;
- 2 alertes communautaires (Gorgonzola d'Italie) ;
- 2 alertes suite à des cas humains.

En 2008, trois alertes produits suivies de rappels ont abouti à une médiatisation. Un rappel produit en Août 2008 d'un saucisson du marin tranché 60g commercialisé dans une grande enseigne a été réalisé. Un autre rappel d'une fromagerie industrielle sur les fromages « perle des étangs » lait de vache et lait de chèvre, « brique des étangs » lait de vache distribués dans 10 départements du sud de la France et dans le département de l'Ain. Un autre rappel pour du Livarot ou Deauville d'une autre fromagerie industrielle a été constaté. Aucun cas humain du à

la consommation de ces produits n'a été confirmée. Le CNRL a été sollicité par les consommateurs pour connaître les risques associés à ces produits.

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 contrôle et de surveillance 2008 pour *Listeria* et lors d'inspection.

3.3.5 ALERTE EUROPEENNE

En 2008, le CNRL a été saisi de deux alertes produits communautaires N°2008/0324 et 2008/0354 concernant de la ricotta salata italienne qui avaient été notifiées par les autorités sanitaires allemandes par le réseau RASFF (Rapid Alerte System for Food and Feed). Consécutivement à la demande faite en 2007 par le CNRL, celui-ci est maintenant informé par la DGAI des alertes européennes au moyen du réseau RASFF.

À la demande de la DGAI, le CNRL a obtenu auprès de ses collègues allemands les souches de ces alertes produits européennes et les souches des lots incriminés ayant fait l'objet d'une circulation sur le territoire français. Aucun cas humain ne fut relié sur le territoire français à ces souches d'alertes produits européennes.

3.3.6 ALERTE CANADIENNE

Le 27 Août 2008, le CNRL a été informé par la DGAI par l'intermédiaire du réseau RASFF d'une épidémie au Canada liée aux produits de viande de la marque MAPLE LEAF qui livre notamment les restaurations collectives dont les centres de soins. Un rappel de 200 produits carnés de cette marque fabriqués dans l'établissement 97B a été effectué. Aucun pays de l'Union Européenne n'était destinataire de ces produits. Cependant, les Iles de Saint Pierre et Miquelon sont livrées directement par le Canada en denrées alimentaires, mais les produits incriminés ne semblent pas avoir été présents sur ce territoire. Selon les informations détenues par le CNRL, l'épidémie fit 31 cas confirmés de listériose et 32 cas suspects, la plupart en Ontario.

L'OMS et la FAO ont identifié le CNRL comme référent pour des conseils sur la gestion de crise de listériose. Nous avons donc échangé des informations avec nos collègues de la Public Health Agency of Canada / Santé Canada pour la gestion de cette crise et avons renseigné les media canadiens qui voulaient comparer l'épidémie canadienne à l'épidémie française de 1992. Une demande du Canada fut également de comprendre le système de surveillance français pour tenter d'en tirer des recommandations au niveau national canadien.

Le CNRL s'est tenu informé de l'évolution de cette épidémie par ses homologues canadiens ainsi que l'ambassade du Canada à Paris et du possible retour de ressortissants français ayant séjourné au Canada et ayant consommé ce type de produits. Suite à l'afflux de demandes de professionnels de santé français confrontés à des patients revenant du Canada et du public

revenant du Canada, le CNRL a sollicité la DGS pour réaliser une information officielle sur cette crise aux professionnels de santé et de la gestion des éventuels cas. En parallèle, le CNRL a reçu les profils des clones épidémiques de la Public Health Agency of Canada (Dr Céline Nadon et Dr Jeffrey FARBER), et n'a pas constaté de cas humain français associé. Le CCOMS *Listeria* n'a pas reçu ces souches pour expertise.

Suite à cette épidémie, 11 alertes alimentaires furent effectuées pour 11 fromages au Québec avec destruction de grands stocks de fromages chez les fromagers et les fromageries. Des cas humains (22 patients) furent associés à ces contaminations de fromages.

3.3.7 ENQUETE DES FORMES NEUROMENINGEES

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 neuroméningées, a commencé en août 2001.

On définit pour 2008 un cas de forme neuroméningée 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 2008 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, les 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.

Les membres de la Cellule *Listeria* sont prévenus par courriel 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 CNRL 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*.

3.4 CONCLUSION

Comme pour la plupart des pays industrialisés, le système de surveillance microbiologique de la listériose, qui se fonde sur l'étude des souches par le CNRL, est un système dépendant du 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.).

Le retour en 2008 aux chiffres de 2006 peut être la conséquence d'une surveillance alimentaire accrue. Ceci illustre donc la nécessité de poursuivre une forte mobilisation de l'industrie agro-alimentaire en matière d'hygiène et de contrôle, tout en poursuivant la sensibilisation des groupes de personne à risque et des professionnels de santé.

Afin de préciser les caractéristiques médicales des patients et de mieux connaître la pathologie induite par *L. monocytogenes*, nous allons participer, avec l'InVS et avec comme promoteur l'Assistance Publique – Hôpitaux de Paris, à une étude prospective clinique et microbiologique (MONALISA), pouvant contribuer à l'amélioration de nos connaissances de cette pathologie et ainsi participer à l'optimisation du système de surveillance. Celle-ci devrait notamment permettre de mieux comprendre la raison de l'augmentation du nombre de cas observés ces 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 la copie d'articles sur *Listeria* en respectant les droits de Copyright et peut procurer une liste de références sur un sujet associé sur *Listeria* et/ou la listériose.

→ En 2008, par exemple, de nombreux étudiants ont demandé des copies d'articles 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 et 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].

4.2.1 SITE INTERNET

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, le rapport d'activité du CNRL et une rubrique de réponses aux questions fréquemment posées au CNRL (FAQ).

Le CNRL répertorie 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.

Dans ce cadre en 2008, il a participé à la relecture et aux corrections d'une fiche synthétique sur la Prévention de la femme enceinte envers la listériose demandée par Julie Toury de Infobebes.com : <http://grossesse.infobebes.com/sante/les-petits-maux/la-listeriose>, ainsi que la page « La listériose chez la femme enceinte » de [santepratique.fr](http://www.santepratique.fr) par Marie Bazet : <http://www.santepratique.fr/listeriose-femme-enceinte.php>.

4.2.2 COURS ET CONFERENCES SUR INVITATION

En 2008, les collaborateurs du CNRL ont donné 3 cours :

- Cours sur « *Listeria monocytogenes* », ADRIA Développement de Quimper, formation continue « Bactéries pathogènes en alimentaire », Rennes, le 25/09/08, 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, 03 Juin 2008, A. Leclercq.
- Cours sur les *Listeria*, Institut Pasteur de Lille, Lille, Cours Le point sur les principaux microorganismes pathogènes, 03 Décembre 2008, A. Leclercq.

4.2.3 FORMATION ET ENCADREMENT

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

→ En 2008, nous avons accueilli 2 stagiaires de différentes formations et origine :

- M. Hervé-Bazin (Elève Pharmacienne, Faculté de Pharmacie de Chatenay-Malabry, Université Paris Sud 11) ayant effectué un stage dans le cadre de son stage M1 d'initiation à la recherche sur « *Antibiorésistance des Listeria monocytogenes d'origine humaine de 1963 à 1987 en France* ».
- G. Almeida (Docteur en Sciences, Ecole Supérieure de Biotechnologie, Université Catholique Portugaise, Portugal) ayant effectué un stage sur « *Listeria monocytogenes dans le fromage : occurrence, sources de contamination et de risques pour la santé publique* » et pour la mise au point d'un système de surveillance microbiologique au Portugal.

→ En 2008, les responsables du CNR *Listeria* ont encadré et ont été membres du jury de différentes thèses de doctorat d'université, thèse de doctorat d'état (DES) et de mémoire de fin d'études:

- Julien Fosse, Inspecteur de la Santé Publique Vétérinaire, « Valeur informative d'indicateurs *ante et post mortem* pour la détection des dangers biologiques transmis à l'homme par la consommation des viandes de porc », Ecole doctorale Vie-Agro-Santé de l'Université de Rennes, (A. Leclercq).

- A. Leymarie, sage-femme, mémoire de fin d'étude, *Listeria monocytogenes* chez la femme enceinte : évolution en France de 1987 à 2006 et étude des caractéristiques de 52 cas de listériose materno-fœtale, soutenance d'avril 2008, (A. Le Monnier).

- Rapporteur du doctorat de thèse en Sciences de l'université PARIS IX Orsay mention Bioinformatique de Mme I. GRISSA sur « Les CRISPRs, instruments d'étude de l'évolution inter ou intra spécifique chez les microorganismes », (A. Leclercq).

4.2.4 JOURNEES PORTES OUVERTES

Les 22 et 23 Novembre 2008, le CNRL avec le Groupe à cinq ans « Microorganismes et barrières de l'hôte » ont participé aux journées portes ouvertes de l'Institut Pasteur. Des explications aux groupes de visiteurs sur ce qu'est un CNR et la listériose ont été dispensées, et les activités de recherches ont été présentées.

4.2.5 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 2008.

Nous avons reçu plus de 400 messages par courrier électronique sur l'ensemble de l'année 2008 (~8/semaine) et 560 appels téléphoniques (~11/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);
- 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, appels)).

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) ;
- 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).

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 2009. 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).

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 CNRL 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 2008 le CNRL a reçu des souches isolées de patient, 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 183 souches d'origine environnementale et/ou alimentaire (contre 107 en 2007, soit +71%), adressées par des laboratoires d'hygiène et de contrôle des aliments pour leur identification et leur caractérisation (cf. chapitre 2.3.2.).

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

En 2008 les responsables du CNRL ont contribué à la révision des normes internationales et européennes pour les *Listeria* en microbiologie des aliments.

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

Expertise de publications

En 2008, un responsable du CNRL était relecteur et membre de comité de rédaction de journaux tel qu'Eurosurveillance, PLoS pathogens, Journal of Food Protection, International Journal of Food Microbiology, Journal of Analytical Methods, etc. Dans ce cadre, 9 publications sur *L. monocytogenes* ont été examinées en 2008.

Expertises dans des comités nationaux, européens ou internationaux

Les responsables du CNRL sont membres de plusieurs instances en tant qu'experts ou conseillers (ECDC groupe *Listeria*, *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.).

Lors de plusieurs réunions à l'AFSSA du CES Microbiologie, le sujet de l'augmentation des cas de listériose a été abordé et a été argumentée par le CNRL.

Conseil auprès de Ministère

En 2008, le CNRL a conseillé la DGAI sur les prélèvements de surface dans des ateliers alimentaires et sur des méthodes analytiques lors de demande de la Cellule *Listeria*.

Le CNRL a été membre de rapports sur saisine à la demande de l'AFSSA.

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 (quelqu'en 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. Le CNRL a donc participé avec l'InVS à la publication d'un article sur l'augmentation des cas de listérioses (V. Goulet, A. Leclercq, V. Vaillant, A. Le Monnier, E. Laurent, F. Thierry-Bled, N. Pihier, H. de Valk. 2008. Augmentation récente de la listériose en France. BEH 30-31 :268-272.) et a mis son rapport d'activité approuvé par le Comité des CNR en ligne sur son site web.

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 2008, le rapport d'activité pour l'année 2007 a été mis en ligne sur notre site web et adressé à tous les institutionnels investis dans la surveillance de la listériose ainsi qu'à toute personne en faisant la demande.

En 2009, 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, gynécologues, généralistes, pédiatres, hygiénistes hospitaliers, etc.) sur un bilan de la listériose en France en 2008.

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

Le G5 « Microorganismes et Barrières de l'hôte » qui héberge 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 G5 « Microorganismes et Barrières de l'hôte » est affilié aux départements « Infection & Epidémiologie » et « Biologie Cellulaire et Infections ». Le département « Infection & Epidémiologie » regroupe des structures de recherche pasteurienne dont la thématique comporte une dimension médicale et de santé publique.

Au cours des prochaines années, le CNRL 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 ou les recherches déjà citées dans le chapitre 2. ne sont pas décrites dans ce chapitre.

5.1 CONTRIBUTIONS AUX ETUDES EPIDEMIOLOGIQUES

5.1.1 EVALUATION DES CRITERES D'INVESTIGATION DES CAS GROUPES.

Responsables du projet au CNRL : A. LECLERCQ

En collaboration avec l'Institut national de Veille Sanitaire (V. GOULET)

L'analyse rétrospective de tous les cas groupés de listériose signalés par le CNRL entre 2000 et 2004 avait permis de redéfinir les critères de signalement. Les résultats de cette étude suggéraient une approche en 2 temps : 1) si 3 cas groupés sont identifiés durant une période de 6 semaines, le CNRL 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 permettent de réduire le nombre d'investigations improductives en concentrant les efforts des pouvoirs publics sur les cas les plus critiques.

En 2008, l'InVS a sollicité le CNRL pour connaître rétrospectivement ce qu'aurait donné la surveillance si le critère de 14 semaines pour définir un signalement avant 2006 n'avait pas été changé pour 6 semaines. Le CNRL a mis au point un programme informatique permettant de changer les critères du signalement et a simulé plusieurs scénarios sur sa base de données. Il faut néanmoins être conscient que cette base est dynamique et que les résultats de la surveillance semaine par semaine ne sont pas ceux d'une surveillance rétrospective. En effet, les souches arrivants secondairement sont intégrées a posteriori dans la base, alors que lors de la surveillance en temps réel, elles sont inconnues. Cette analyse se poursuit actuellement.

5.1.2 AUGMENTATION DU NOMBRE DE CAS FRANÇAIS DE LISTERIOSES

Responsables du projet au CNRL : M. Lecuit - 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)

Présentations orales :

- **Conférence des CNR « Des pathogènes et des hommes »**, Institut Pasteur, Paris. 31 Mars 2008. A. Leclercq. Communication orale « 2007 : L'odyssée de la listériose en France ».
- **95th annual meeting of the International Association for Food Protection**. Columbus (USA). Août 2008. Communication orale, "Increasing incidence of Listeriosis in France and its relations with host factors and food control".
- **Journées de veille sanitaire, InVS**. Centre des congrès de la Villette, Paris. 27 Novembre 2008. Communication orale. V. Goulet, A. Leclercq, V. Vaillant, M. Lecuit, E. Laurent, F. Thierry-Bled, N. Pihier, H. de Valk. Recrudescence des cas de listériose en France dans un contexte d'augmentation de l'incidence en Europe.
- **28^e réunion interdisciplinaire de chimiothérapie infectieuse RICAI 2008, Palais des Congrès, Paris. 4 décembre 2008**. Communication orale. A. Leclercq, A. Le Monnier, M. Lecuit, V. Goulet. Increasing incidence of listeriosis in France and its relations with host factors and food control. Abstract 135/31.

L'incidence de la listériose en France a diminué notablement de 1987 à 2001, puis s'est stabilisée ensuite jusqu'en 2005 autour de 3,5 cas/million d'habitants. En 2006, on assiste à une inversion de cette tendance avec une augmentation brusque de l'incidence à 4,6 cas/million d'habitants qui s'est prolongée en 2007 pour atteindre 5,0 cas/million d'habitants. Cette augmentation concerne particulièrement les sujets âgés de 60 ans et plus et les sujets immunodéprimés, quel que soit leur âge. L'incidence des listérioses materno-néonatales reste stable. La plupart des régions sont touchées et la saisonnalité estivale est similaire aux années précédentes. L'augmentation d'incidence n'est pas liée à l'émergence d'une souche particulière et l'augmentation a concerné tant les cas sporadiques que les cas faisant partie d'un cluster. Une augmentation de l'incidence de la listériose a été observée également dans neuf pays européens sur la période 2000-2006, avec des caractéristiques similaires (concerne les personnes âgées de 60 ans et plus, pas de regroupement temporo-spatial et pas d'émergence de souches particulières). Aussi bien en France que dans les autres pays, les raisons de cette augmentation n'ont pas été identifiées. Plusieurs hypothèses permettant d'expliquer cette augmentation récente de l'incidence de la listériose sont discutées.

Les causes de cette augmentation restent inconnues et 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),
- La réduction de la teneur en 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.

Le CNRL participe activement à l'investigation de ces hypothèses selon ses moyens et ses missions.

5.1.3 ETUDE DES FORMES MATERNO-FOETALES DEPUIS 1987

*Responsables du projet au CNRL : A. Le Monnier - A. Leclercq – M. Lecuit
Collaboration avec l'InVS (V. Goulet)*

Une synthèse sur les différents aspects des formes materno-foetales depuis 1987 est en cours de rédaction. Elle vise d'une part à suivre l'évolution de l'incidence des infections durant la grossesse depuis 1987 et d'analyser sur une période plus restreinte (depuis 1999), année de mise en place de la DO, les caractéristiques globales de ces infections notamment les signes cliniques et le pronostic. Par ailleurs, 52 dossiers cliniques (mère et nouveau-nés) correspondant à des cas d'infection materno-foetale diagnostiqués en Ile-de-France entre 2000 et 2006, sont en cours d'analyse. Cette étude, a permis non seulement de préciser les caractéristiques des infections chez la mère et les nouveau-nés et notamment d'évaluer l'impact des mesures de prévention. Un article sur ces données est en cours de rédaction.

5.2 METHODES DE DIAGNOSTIC ET ATYPIES DES SOUCHES

5.2.1 PROFIL ATYPIQUE DE SERO GROUPE PCR DE *L. MONOCYTOGENES*

Responsables du projet au CNRL : H. Dieye - V. Chenal-Francisque - A. Leclercq

En 2006 et 2007, trois profils atypiques de séro groupe PCR de *Listeria monocytogenes* ont été observés. Ces profils avaient déjà été constatés par le CDC d'Atlanta mais inconnus alors en France. Les souches de ces trois profils atypiques appartiennent au sérovar 4b. Les bandes atypiques ont été séquencées. Le CNRL compte publier un amendement à son schéma de groupage PCR en décrivant un nouveau profil pour les souches du groupe PCR IVb.

5.2.2 ABSENCE DE CATALASE DE SOUCHES DE *L. MONOCYTOGENES*

*Responsables du projet au CNR : A. Leclercq – V. Chenal-Francisque – M. Lecuit
En collaboration étroite avec INRA UR 918 Pathologie infectieuse et Immunologie, Tours
(Sylvie Roche et Philippe Velge)*

5 souches de *L. monocytogenes* (*Lm*) catalase négative (alors que le genre *Listeria* est catalase positive) ont été isolées de canards et d'environnement d'abattoirs de volailles. Ces souches ont été comparées à des souches humaines *Lm* catalase négative issues de cas de méningites en Angleterre et en Allemagne. Cette étude a montré que la perte de la catalase ne semblait pas avoir d'impact sur la virulence de la souche, qu'une source de ces souches catalase négative était d'origine alimentaire et que le test catalase qui est le caractère phénotypique majeur du genre *Listeria* doit être reconsidéré. L'origine génétique de cette perte de fonction et son lien avec la virulence des souches sont en cours d'investigation.

5.2.3 PROFILS DE MACRORESTRICTION D'ADN DIFFERENTS POUR DES SOUCHES PROVENANT DU MEME PATIENT

Responsables du projet au CNRL : A. Leclercq – V. Cadet-Daniel - M. Lecuit

Le CNRL a remarqué des profils de macrorestriction d'ADN différents pour des doublons de souches humaines : souches provenant de colonies différentes sur la même boîte d'isolement ou souches provenant du même patient dans des prélèvements différents ou à des dates différentes. Le CNRL évalue les deux hypothèses d'une coinfection par deux souches différentes de *L. monocytogenes* ou l'influence des traitements thérapeutiques sur le patrimoine génétique de la souche contaminant le patient. Des formes cliniques particulières sont associées à ce phénomène.

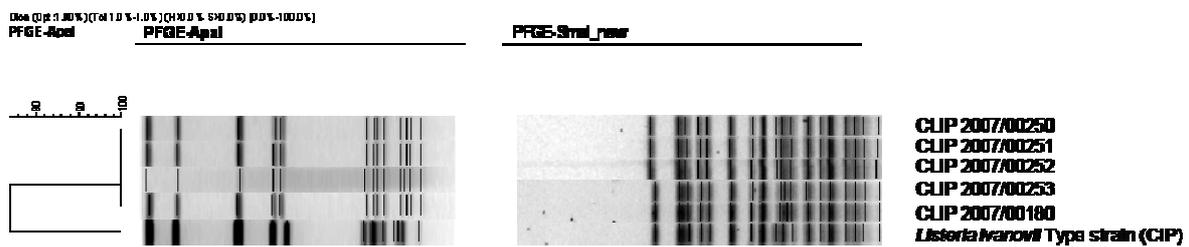
5.3 ETUDE DE LA VIRULENCE

5.3.1 INFECTION A *L. IVANOVII* SUBSP. *IVANOVII*

*Responsables du projet au CNRL : M. Lecuit - A. Leclercq - A. Le Monnier
En collaboration avec M. Scortti et J.A. Vazquez-Boland, University of Edinburgh, Ashworth
Laboratories, Edinburgh, Royaume-Uni.
Article en cours de soumission*

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 20). 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*. À la demande de la Cellule *Listeria*, ces souches humaines ont été comparées à des souches alimentaires et environnementales d>alertes DGA1 (2006/483) et DGCCRF sans trouver de similarité.

Figure 20 : Profils par macrorestriction d'ADN avec les enzymes *ApaI* et *SmaI* des souches de *L. ivanovii subsp. ivanovii* du premier trimestre 2007.



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*.

En 2008, le CNRL a affiné sa méthode de typage pour *L. ivanovii subsp. ivanovii* et a surveillé les souches humaines et non-humaines transmises sans constater de situation identique. Ces cas interpellent sur l'émergence potentielle d'une espèce jusqu'ici généralement considérée comme non pathogène pour l'homme.

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

Responsable du projet au CNRL : S. Grayo – M. Lecuit

Groupe à cinq ans « Microorganismes et barrière de l'hôte »

Article : Disson, O., S. Grayo, E. Huillet, G. Nikitas, F. Langa-Vives, O. Dussurget, M. Ragon, A. Le Monnier, C. Babinet, P. Cossart, and M. Lecuit. 2008. Conjugated action of two species-specific invasion proteins for fetoplacental listeriosis. *Nature* 455:1114-8.

L'ingestion par l'homme d'aliments contaminés par *L. monocytogenes* peut soit n'induire aucun symptôme, soit engendrer une gastroentérite, une septicémie, une infection foeto-placentaire ou une infection du système nerveux central. Afin d'optimiser la prévention et le traitement de la listériose humaine, il est crucial de comprendre la physiopathologie de cette infection rare mais de mortalité élevée. Nous étudions les mécanismes moléculaires qui rendent compte de la capacité de *L. monocytogenes* à franchir les barrières intestinale, placentaire et hémato-encéphalique. Des études *in vitro* ont permis de démontrer la contribution majeure des protéines bactériennes InlA et InlB dans l'internalisation de *L. monocytogenes* dans les cellules non phagocytaires. La génération de modèles murins par transgénèse et knock-in prenant en compte les spécificités d'espèces de ces deux protéines a permis de démontrer leur rôle clé dans le franchissement des barrières de l'hôte. La compréhension du mécanisme de franchissement de la barrière placentaire permet en effet d'envisager la mise au point de molécules capables

d'empêcher l'entrée de *L. monocytogenes*, mais aussi d'imaginer des molécules thérapeutiques qui, elles, seraient capables de pénétrer le placenta.

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 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)

Poster: Second European Scientific Conference on Applied Infectious Disease Epidemiology (ESCAIDE). Centre des congrès, Berlin (Allemagne). A. Leclercq, V. Cadet-Daniel, H. Dieye, A. Morvan, V. Chenal-Francisque, et M. Lecuit. *Improvement of microbiological surveillance of listeriosis by subtyping Listeria monocytogenes by Pulsed-Field gel electrophoresis with a third restriction endonuclease: SmaI.* Abstract 20080224.

Article en cours de rédaction.

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 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. 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.

Cette nouvelle enzyme de restriction *SmaI* est utile pour dissocier les souches reliées ou non lors d'une enquête sur un signalement ou une épidémie où une différence d'une bande a été observée pour les profils *AscI* ou *ApaI* : c'est une aide à l'épidémiologiste pour examiner les signalements ou épidémies à *L. monocytogenes*. Quand les souches de *L. monocytogenes* sont étroitement liées

géographiquement et temporellement par expansion clonale, cette approche par 3 enzymes de restriction devrait fournir un outil de différenciation efficace.

5.5 DEVELOPPEMENT DE NOUVEAUX OUTILS DE TYPAGE MOLECULAIRE ET ETUDE DE LA DIVERSITE DES *LISTERIA*

5.5.1 ANALYSE DE LA STRUCTURE DES POPULATIONS DE *L. MONOCYTOGENES* SUR UN ECHANTILLONNAGE MONDIAL PAR MULTILOCUS SEQUENCE TYPING OF *LISTERIA*

Personnes responsables du projet au CNRL : V. Chenal Francisque – T. Cantinelli - M. Lecuit – A. Leclercq - A. Le Monnier - M. Ragon

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

Article : Ragon, M., T. Wirth, F. Hollandt, R. Lavenir, M. Lecuit, A. Le Monnier, and S. Brisse. 2008. A new perspective on Listeria monocytogenes evolution. PLoS Pathog 4:e1000146.

Le Multilocus Sequence Typing (MLST) combine un pouvoir discriminant élevé pour de nombreuses espèces microbiennes et génère des données standardisées qui sont riches en termes 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 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 sérovars. 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 regroupées sur la base de la PFGE.

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*. Plusieurs groupes (USA, Europe) utilisent cette base de données et des autorités de santé publique européenne ont demandé si elles pouvaient 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*.

En 2008, le CNRL a souhaité élargir ses investigations pour tenter de mieux comprendre l'évolution spatio-temporelle des souches de *L. monocytogenes* en étudiant un large échantillonnage de souches (450 souches) provenant de la collection mondiale du CCOMS. En analysant des souches de différentes origines géographiques collectées au cours du temps, nous souhaitons notamment déterminer si les souches cliniques françaises sont représentatives des souches mondiales et s'il existe des variants spécifiques de zones géographiques données.

5.5.2 LA DIVERSITE ENVIRONNEMENTALE DES *LISTERIA*

*Personnes responsables du projet au CNRL : V. Chenal Francisque – A. Leclercq – M. Lecuit
En collaboration avec la plate-forme de génotypage des pathogènes et santé publique IP-InVS (S. Brisse)*

En 2008, une étude a été initiée sur la diversité environnementale des *Listeria* et la dynamique des populations. Il s'agit d'estimer dans l'environnement la diversité existante et de la comparer à celle des cas humains ou des aliments afin de mieux comprendre la dynamique des populations.

5.6 ETUDE DE LA RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES

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

*En collaboration avec le CNR de la résistance aux antibiotiques (C. Moubareck et P. Courvalin)
Poster : 28^e réunion interdisciplinaire de chimiothérapie infectieuse RICAI 2008, Palais des Congrès, Paris. 4décembre 2008. Communication orale. A. Morvan, C. Moubareck, A. Leclercq, M. Hervé-Bazin, S. Bremont, M. Lecuit, P. Courvalin, A. Le Monnier. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* human strains isolated since 1926 in France. Abstract 136/31.*

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.

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 (Charpentier et Courvalin, 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. Plusieurs études ont récemment rapporté une augmentation du taux de résistance à un ou plusieurs antibiotiques, y compris l'ampicilline (Srinivasan et coll., 2005), parmi les souches isolées de l'environnement (Charpentier et coll., 1995, 1999) 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. C'est pourquoi en 2007, le CNRL en collaboration avec le CNR de la résistance aux antibiotiques a entrepris de synthétiser les données concernant l'ensemble des souches résistantes isolées de patients depuis 1926 (description des différents profils de sensibilité, des données de typage moléculaire existantes, et des mécanismes de résistances caractérisées).

5856 souches de *L. monocytogenes* du CNRL ont été sélectionnées au hasard dans le but d'obtenir un échantillon représentatif de chaque forme clinique. Leur susceptibilité à 23 antibiotiques d'intérêt clinique a été déterminée par la méthode de la diffusion par disque. Les CMI des fluoroquinolones et des pénicillines ont été déterminées par E-test. Toutes les souches résistantes ont été typées par PFGE avec les enzymes de restriction *AscI* et *ApaI* et ceux montrant un profil unique ont été étudiés pour la présence des gènes de résistance aux antibiotiques par PCR.

Un total de 69 souches (1,2% des souches analysées de *L. monocytogenes*) était résistant à un ou plusieurs antibiotiques. La résistance à la norfloxacin et à la ciprofloxacine de 31 isolats (24 pulsotypes) était attribuée à un efflux actif. La résistance à la tétracycline et à la minocycline de 31 souches (12 pulsotypes) était encodée par *tet(M)*, portée présomptivement par un transposon conjugatif dans les 14 souches qui portaient aussi le gène *int*. La haute résistance à la triméthoprime du au gène *dfrD* était trouvée dans une souche. Le gène conférant la résistance au chloramphénicol dans 2 souches (2 pulsotypes) appartenait à la famille *cat*. La caractérisation des isolats résistant à l'acide fusidique, aux macrolides et à la streptomycine sont en cours.

L. monocytogenes n'a donc pas acquis de résistance significative aux antibiotiques. Il est notable qu'aucune émergence ou extension de la résistance aux traitements antibiotiques de référence de la listériose et aucune évolution des CMI à travers les années n'ont été observée.

Ces résultats permettront également d'établir des recommandations et des références pour réaliser les antibiogrammes sur les *Listeria*.

5.7 VALIDATION DE NOUVELLES THERAPEUTIQUES

5.7.1 LA MOXIFLOXACINE

Responsables du projet au CNRL : S. Grayo – A. Le Monnier

Articles:

Grayo, S., O. Join-Lambert, M. C. Desroches, and A. Le Monnier. 2008. Comparison of the in vitro efficacies of moxifloxacin and amoxicillin against Listeria monocytogenes. Antimicrob Agents Chemother 52:1697-702.

Grayo, S., M. C. Lott-Desroches, O. Dussurget, R. Respaud, A. Fontanet, O. Join-Lambert, E. Singlas, and A. Le Monnier. 2008. Rapid eradication of Listeria monocytogenes by moxifloxacin in a murine model of central nervous system listeriosis. Antimicrob Agents Chemother 52:3210-5.

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 neuroméningées. C'est pourquoi certains auteurs ont suggéré que le traitement de référence de la listériose pouvait être optimisé (Hof et coll., 1997). De plus, l'émergence potentielle de résistance doit être anticipée en validant de nouvelles alternatives thérapeutiques.

Listeria monocytogenes est une bactérie intracellulaire facultative à l'origine d'infections sévères du système nerveux central dont le pronostic reste réservé malgré un traitement antibiotique bien conduit. 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.

Ceci souligne la nécessité de développer de nouvelles alternatives afin d'améliorer le pronostic des patients infectés par *Listeria monocytogenes*. La moxifloxacine, une fluoroquinolone de dernière génération, présente des propriétés intéressantes contre les bactéries à Gram négatif mais également sur les bactéries à Gram positif, comme *Listeria monocytogenes*. La moxifloxacine a 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 neuroméningées par *L. monocytogenes*. L'ensemble des données du CNRL suggère que la moxifloxacine constitue une alternative de choix dans le traitement des listérioses neuroméningées. Cependant, la moxifloxacine vient de faire récemment l'objet d'une restriction d'AMM en raison de cas d'hépatites graves.

5.8 PROJETS COLLABORATIFS

Enfin, grâce à son expertise dans le domaine de *Listeria* et de la listériose, le CNRL G5 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 – V. Caro): 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* ;
 - Unité de Pharmacoépidémiologie et maladies infectieuses (D. Guillemot) / Unité de Recherche et d'Expertise Epidémiologie des Maladies Emergentes (A. Fontanet): Etude longitudinale de la base de données du CNRL
 - Unité de Génétique des Génomes Bactériens (Ph. Glaser): étude de la diversité de *L. ivanovii subsp. ivanovii*

- d'autres équipes (Hôpitaux Necker-Enfants malades et Cochin (APHP), INRA, CDC d'Atlanta, Faculté vétérinaire de Sassari et de Bologne, Italie).

5.9 CONCLUSION

Comme l'illustre ce chapitre du rapport, la recherche constitue une part importante de notre activité, complémentaire des activités liées à la surveillance au quotidien de la listériose humaine. Cette recherche 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 interspécifique de *L. monocytogenes*. Cette approche devrait nous permettre d'identifier des 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.

6 LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

6.1 PUBLICATIONS NATIONALES

- *A. Le Monnier, A. Leclercq.* 2009. **Listeria et listériose : des animaux d'élevage à nos assiettes.** Pathologie Biologie Pathol Biol (Paris) **57**:17-22.
- V. Goulet, A. Leclercq, V. Vaillant, A. Le Monnier, E. Laurent, F. Thierry-Bled, N. Pihier, H. de Valk. 2008. **Augmentation récente de la listériose en France.** BEH 30-31 :268-272.
- Révision du chapitre recommandations sur« *Listeria* » du Guide des mamans le 17/04/08 avec A. PEUZERAT.

6.2 PUBLICATIONS INTERNATIONALES

- **Disson, O., S. Grayo, E. Huillet, G. Nikitas, F. Langa-Vives, O. Dussurget, M. Ragon, A. Le Monnier, C. Babinet, P. Cossart, and M. Lecuit.** 2008. Conjugated action of two species-specific invasion proteins for fetoplacental listeriosis. **Nature** **455**:1114-8.
- **Goulet, V., C. Hedberg, A. Le Monnier, and H. de Valk.** 2008. Increasing incidence of listeriosis in France and other European countries. **Emerg Infect Dis** **14**:734-40.
- **Grayo, S., O. Join-Lambert, M. C. Desroches, and A. Le Monnier.** 2008. Comparison of the in vitro efficacies of moxifloxacin and amoxicillin against *Listeria monocytogenes*. **Antimicrob Agents Chemother** **52**:1697-702.
- **Grayo, S., M. C. Lott-Desroches, O. Dussurget, R. Respaud, A. Fontanet, O. Join-Lambert, E. Singlas, and A. Le Monnier.** 2008. Rapid eradication of *Listeria monocytogenes* by moxifloxacin in a murine model of central nervous system listeriosis. **Antimicrob Agents Chemother** **52**:3210-5.
- **Parihar, V. S., G. Lopez-Valladares, M. L. Danielsson-Tham, I. Peiris, S. Helmersson, M. Unemo, B. Andersson, M. Arneborn, E. Bannerman, S. Barbuddhe, J. Bille, L. Hajdu, C. Jacquet, C. Johansson, M. Lofdahl, G. Mollerberg, H. Ringberg, J. Rocourt, I. Tjernberg, J. Ursing, B. Henriques-Normark, and W. Tham.** 2008. Characterization of human invasive isolates of *Listeria monocytogenes* in Sweden 1986-2007. **Foodborne Pathog Dis** **5**:755-61.
- **Ragon, M., T. Wirth, F. Hollandt, R. Lavenir, M. Lecuit, A. Le Monnier, and S. Brisse.** 2008. A new perspective on *Listeria monocytogenes* evolution. **PLoS Pathog** **4**:e1000146.

6.3 COMMUNICATIONS NATIONALES

- **Conférence des CNR « Des pathogènes et des hommes »**, Institut Pasteur, Paris. 31 Mars 2008. A. Leclercq. Communication orale « *2007 : L'odyssée de la listériose en France* ».
- **Conférence des CNR « Des pathogènes et des hommes »**, Institut Pasteur, Paris. 31 Mars 2008. M. Lecuit. Communication orale « *Traversée des barrières de l'hôte par *Listeria monocytogenes** ».
- **Journées de veille sanitaire, InVS**. Centre des congrès de la Villette, Paris. 27 Novembre 2008. Communication orale. V. Goulet, A. Leclercq, V. Vaillant, M. Lecuit, E. Laurent, F. Thierry-Bled, N. Pihier, H. de Valk. Recrudescence des cas de listériose en France dans un contexte d'augmentation de l'incidence en Europe.
- **28^e réunion interdisciplinaire de chimiothérapie infectieuse RICAI 2008, Palais des Congrès, Paris. 4 décembre 2008**. Communication orale. A. Morvan, C. Moubareck, A. Leclercq, M. Hervé-Bazin, S. Bremont, M. Lecuit, P. Courvalin, A. Le Monnier. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* human strains isolated since 1926 in France. Abstract 136/31.
- **28^e réunion interdisciplinaire de chimiothérapie infectieuse RICAI 2008, Palais des Congrès, Paris. 4 décembre 2008**. Communication orale. A. Leclercq, A. Le Monnier, M. Lecuit, V. Goulet. Increasing incidence of listeriosis in France and its relations with host factors and food control. Abstract 135/31.
- **28^e réunion interdisciplinaire de chimiothérapie infectieuse RICAI 2008, Palais des Congrès, Paris. 5 décembre 2008**. Communication orale. M. Lecuit. *Listeria*: Actualités. Abstract 226/56sep.

6.4 COMMUNICATIONS INTERNATIONALES

- **95th annual meeting of the International Association for Food Protection**. Columbus (USA). Aout 2008. Communication orale, "*Increasing incidence of Listeriosis in France and its relations with host factors and food control*".
- **Second European Scientific Conference on Applied Infectious Disease Epidemiology (ESCAIDE)**. Centre des congrès, Berlin (Allemagne). Communication orale. A. Leclercq, V. Cadet-Daniel, H. Dieye, A. Morvan, V. Chenal-Francisque, and M. Lecuit. Improvement of microbiological surveillance of listeriosis by subtyping *Listeria monocytogenes* by Pulsed-Field gel electrophoresis with a third restriction endonuclease : *SmaI*. Abstract 20080224.

6.5 CONFERENCES SUR INVITATIONS

- **Congrès du laboratoire communautaire de référence et des laboratoires nationaux de référence des *Listeria monocytogenes*.** AFSSA, Paris. 10 Avril 2008. Communications orales “Activities of the WHO collaborative centre for Listeria and the National Reference Centre for Listeria” and “Outcome of the enquiry on non-haemolytic Lm strains and impact on public health-notion of pathogenicity”.
- **First annual meeting of the Food and waterborne diseases (FWD) network in Europe.** ECDC, Stockholm, Suède. 1-2 Octobre 2008. Participation au groupe *Listeria* en collaboration avec l’InVS.

6.6 INTERVIEWS TELEVISEES OU RADIOS

- **France 5 - Le magazine de la santé**, le 28/01/08 à 14 :01 h, « La listériose », A. Leclercq, 7 minutes;
- **France Info**, le 22/07/08, Samantha Delbos, par téléphone, reportage radio spéciale sortie BEH recrudescence de la listériose ;
- **France 2, 20h** du 22/07/08, Perrine Bonnet, demande d'interview télévisée;
- **CBC Radio-Canada**, le 31/08/08, Chantal Srivastava . Interview sur les épidémies alimentaires dans le cadre de l’épidémie Canadienne, http://www.radio-canada.ca/audio-video/pop.shtml?urlMedia%3DMedianet/2008/CBF/LesAnneeslumiere200808311215_2.asx;
- **CBC Radio-Canada**, le 09/09/08, interview de Viviane Chenal Francisque, sur la listériose et l’épidémie canadienne.
- **France 5- Le magazine de la santé**, le 08/09/08 à 14 :01 h, « La listériose », A. Leclercq, 7 minutes. Interview par Marie Renard sur la recrudescence des cas.
- **CBC Radio-Canada**, le 26 octobre 2008 à 13 :01, émission « la semaine verte » thème « la crise chez les fromagers », interview sur l’épidémie de listériose française de 1992 par M. Bilobeau.. http://www.radio-canada.ca/audio-video/pop.shtml?urlMedia%3Dhttp://www.radio-canada.ca/Medianet/2008/CBFT/LaSemaineVerte200810261301.asx&promo%3DZAPmedia_LaSemaineVerte

6.7 ARTICLES DE PRESSE NATIONALE

- **Le figaro** du 22/07/08 : article sur « Recrudescence de la listériose en France » ;
- **Le Monde** du 21/03/08 : article sur « Bien ranger pour bien conserver » ;
- **60 millions de consommateurs**, hors-série N°139 (Sept./Oct. 2008) sur l’alimentation « Manger sain »/Risque alimentaire, journaliste Karine Jacquet, article « La listériose, rare mais dangereuse » page 8-9.
- **La Nouvelle République** du 04/2008 : article sur l’Institut Pasteur et sur le CNR *Listeria*.

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 2008, le programme de travail plus spécifique aux activités d'Expertise du CNRL pour les années 2009-2010 comportera les aspects suivants :

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

- Utilisation de la base de données MLST et de cette technique 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;
- Mise au point d'une méthode MLVA de référence pour *L. monocytogenes* ;

Aspects diagnostiques :

- évaluation des performances comparées des différents tests PCR et/ou sérologiques actuellement disponibles dans le diagnostic de listériose à partir des données clinico-biologiques obtenus pas le biais de l'étude MONALISA, actuellement soumise à l'appel d'offre PHRC national;
- 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 :

- évaluation de l'antibiorésistance des *L. monocytogenes*
- 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*.

Aspects diagnostiques-thérapeutiques-cliniques (en collaboration avec l'InVS) :

- Participation au projet MONALISA si les moyens financiers (PHRC national) sont accordés

8 CONCLUSION GENERALE

Le CNRL, en lien avec l'InVS, a observé en 2008, 272 cas de listériose, correspondant à une incidence de 4,3 cas/million d'habitants, comparable à l'année 2006, et en légère diminution par rapport à l'année 2007 (299 cas, incidence de 5 cas/million d'habitants). Cette incidence reste élevée par rapport aux années 2001-2005. Il est difficile de conclure à ce stade si l'année 2008 illustre l'amorce d'une ré-inversion de tendance, ou si l'on assiste à une variation interannuelle non significative, dans un contexte général national et européen à la hausse depuis 2005 (Goulet et coll., 2008). Ceci souligne l'importance de ne pas alléger la surveillance microbiologique et épidémiologique de la listériose, surtout au regard des épidémies canadiennes, qui sont survenues dans un pays où ce pathogène semblait être maîtrisé. Une diminution des formes bactériémiques jusqu'alors en augmentation et une augmentation des formes neuroméningées ont été relevées. Par ailleurs, le nombre et la valeur relative des formes materno-néonatales a atteint l'un des niveaux les plus bas depuis 1987. La population la plus à risque semble donc être constituée principalement des personnes de plus de 60 ans avec ou sans terrain sous-jacent (77 % des cas non materno-néonataux).

Le CNR des *Listeria* (CNRL), en lien avec l'InVS, a fait part de l'augmentation des cas constatée depuis 2005 dans des publications scientifiques ainsi que destinées au grand public. Les acteurs de la Santé Publique aux niveaux national et international (correspondants européens et OMS) étudient actuellement les causes de cette augmentation récente afin de proposer des recommandations appropriées.

Le CNRL, qui constitue un acteur central du système de surveillance français, 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.

Dans le cadre de ses missions de veille technologique, le CNRL a développé et validé de nouvelles méthodes de typage moléculaire, telles que la MLST, en collaboration avec la plateforme de génotypage des pathogènes et de Santé Publique. Une étude longitudinale en collaboration avec le CNR de la résistance aux antibiotiques a montré que les souches cliniques de *L. monocytogenes* étaient en majorité sensibles aux antibiotiques utilisés dans les traitements de référence, ce qui n'écarte pas l'intérêt du développement de traitements alternatifs, notamment dans un contexte d'allergie aux β -lactamines, dans un souci d'une meilleure efficacité, ou dans le contexte d'une possible émergence de résistance. Par ailleurs, dans le cadre de collaborations scientifiques au sein de l'Institut Pasteur et extérieurs, le CNRL poursuit ses travaux visant à améliorer le diagnostic et 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), à mieux comprendre la physiopathologie de la listériose humaine et à valider de nouvelles approches thérapeutiques.

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
- Charpentier, E., and P. Courvalin. 1999. Antibiotic resistance in *Listeria* spp. *Antimicrob Agents Chemother* 43:2103-8.
- Cotter, P. D., L. A. Draper, E. M. Lawton, K. M. Daly, D. S. Groeger, P. G. Casey, R. P. Ross, and C. Hill. 2008. Listeriolysin S, a novel peptide haemolysin associated with a subset of lineage I *Listeria monocytogenes*. *PLoS Pathog* 4:e1000144.
- 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.

Disson, O., S. Grayo, E. Huillet, G. Nikitas, F. Langa-Vives, O. Dussurget, M. Ragon, A. Le Monnier, C. Babinet, P. Cossart, and M. Lecuit. 2008. Conjugated action of two species-specific invasion proteins for fetoplacental listeriosis. *Nature* 455:1114-8.

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* sérovars 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* sérovars 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.

Dussurget, O., D. Cabanes, P. Dehoux, M. Lecuit, C. Buchrieser, P. Glaser, and P. Cossart. 2002. *Listeria monocytogenes* bile salt hydrolase is a PrfA-regulated virulence factor involved in the intestinal and hepatic phases of listeriosis. *Mol Microbiol* 45:1095-106.

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.

FAO and WHO – Exemple de la cellule “*Listeria*”. In : Conférence paneuropéenne sur la sécurité sanitaire et la qualité des aliments, document de séance de la délégation française, 2002, Budapest, Hongrie.

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. *Emerg Infect Dis.* 2008 May;14(5):734-40.
- Goulet, V., Leclercq, A., Vaillant, V., Le Monnier, A., Laurent, E., Thierry-Bled, F., Pihier, N., et H. de Valk. Recrudescence récente des cas de listériose en France. *Bull. Epidemiol. Hebdom.*, 2008, 268-272.
- 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.
- Hof, H., T. Nichterlein, and M. Kretschmar. 1997. Management of listeriosis. *Clin Microbiol Rev* 10:345-57.
- 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.
- Jacquet, C., M. Doumith, et al. A molecular marker for evaluating the pathogenic potential of foodborne *Listeria monocytogenes*, J Infect Dis, 2004, **189**(11): 2094-100.
- 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.
- Join-Lambert, O. and S. Kayal (2005). "*Listeria*." In: AntibioGramme. Courvalin P., Leclercq R., Bingen E. - 2ème édition
- 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.
- Leclercq, A. 2004. Atypical colonial morphology and low recoveries of *Listeria monocytogenes* strains on Oxford, PALCAM, Rapid'L.mono and ALOA solid media. J Microbiol Methods 57:251-8.
- Lecuit, M., S. Vandormael-Pournin, et al. A transgenic model for listeriosis: role of internalin in crossing the intestinal barrier, Science, 2001, 292(5522): 1722-5.
- 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.
- Le Monnier, A., and A. Leclercq. 2009. [*Listeria* and listeriosis: From farm to fork.]. Pathol Biol (Paris) 57:17-22.
- 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.
- Ragon, M., T. Wirth, F. Hollandt, R. Lavenir, M. Lecuit, A. Le Monnier, and S. Brisse. 2008. A new perspective on *Listeria monocytogenes* evolution. *PLoS Pathog* 4:e1000146.
- 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., Quoraishi 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 sérovar and phagovar characteristics. *Lancet*, 1989, 334, 1217-1218.
- Rocourt J., Grimont F., Grimont P.A.D., Seeliger H.P.R. DNA relatedness among sérovares 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.
- Scotti, M., L. Lacharme-Lora, M. Wagner, I. Chico-Calero, P. Losito, and J. A. Vazquez-Boland. 2006. Coexpression of virulence and fosfomycin susceptibility in *Listeria*: molecular basis of an antimicrobial in vitro-in vivo paradox. Nat Med 12:515-7.
- 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.