



**CENTRE NATIONAL  
DE REFERENCE  
DES *LISTERIA***

DATE : Mars 2010

<b>RESPONSABLE :</b>	<b>M. LECUIT</b>
<b>RESPONSABLE ADJOINT :</b>	<b>A. LECLERCQ</b>
<b>INGENIEUR :</b>	<b>V. CHENAL-FRANCISQUE</b>
<b>TECHNICIENS :</b>	<b>T. CANTINELLI</b>
	<b>H. DIEYE</b>
	<b>A. MORVAN</b>
<b>SECRETAIRE :</b>	<b>M. BELIN</b>



*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. 2010. Rapport annuel d'activité du Centre national de Référence des Listeria – Année 2009. 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 2009 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

<b>RESUME DE L'ANNEE 2009.....</b>	<b>9</b>
<b>1 INTRODUCTION.....</b>	<b>11</b>
1.1 Personnel permanent.....	15
1.1.1 Organigramme general .....	15
1.1.2 Effectif.....	16
1.2 Locaux.....	17
1.3 Equipement .....	18
1.4 Mise en place de la démarche de management de la Qualité et hygiène/sécurité au sein du CNRL ...	19
1.5 Plan de continuité d'activité.....	20
<b>2 ACTIVITES D'EXPERTISE DU CNR DES <i>LISTERIA</i>.....</b>	<b>21</b>
2.1 Capacités techniques, rôles et missions du CNR des <i>Listeria</i> .....	21
2.1.1 Identification et caractérisation des souches de <i>Listeria</i> .....	21
2.1.1.1 Méthodes et marqueurs épidémiologiques disponibles.....	21
2.1.1.2 Techniques développées en 2009.....	24
2.1.1.3 Méthodes en développement .....	24
2.1.1.4 Méthodes en cours de validation.....	25
2.1.1.4.1 Evaluation des kits de sérodiagnostic et de PCR.....	25
2.1.1.4.1.1 Projet MONALISA .....	26
2.1.1.4.2 Evaluation du milieu RAPID L.MONO™ et du test de confirmation en 6h .....	26
2.1.2 Maintien, détention et diffusion de matériel biologique .....	27
2.1.2.1 Les souches bactériennes .....	27
2.1.2.2 Les Serums.....	29
2.1.2.3 Les bactériophages.....	30
2.1.2.4 Diffusion et échange de matériel biologique .....	30
2.1.2.5 Conditions de mise à disposition de ces collections .....	30

2.1.3	Techniques recommandées par le CNRL .....	31
2.1.3.1	Recommandations générales.....	31
2.1.3.1.1	En microbiologie clinique.....	31
2.1.3.1.2	En microbiologie vétérinaire.....	33
2.1.3.1.3	En microbiologie des aliments.....	33
2.1.4	Travaux d'évaluation et d'amélioration des techniques, réactifs et troussees .....	37
2.1.5	Gestion, protection et sauvegarde de la base de données du CNRL.....	37
2.2	Surveillance de la listériose humaine en France.....	38
2.2.1	Surveillance microbiologique de la listériose en France.....	39
2.2.2	Surveillance et signalement.....	41
2.2.3	Phase de surveillance renforcée.....	42
2.2.4	Phase d'Alerte .....	42
2.2.5	Surveillance de la résistance aux antibiotiques .....	43
2.2.6	Détection et analyse des infections nosocomiales .....	44
2.3	Contribution aux réseaux de surveillance européens et internationaux.....	45
2.3.1	Laboratoire Communautaire de Référence des <i>Listeria monocytogenes</i> .....	45
2.3.2	European Center for Diseases Control: ECDC.....	46
2.3.3	Centre Collaborateur OMS (CCOMS).....	46
2.3.4	PulseNet Europe.....	48
2.3.5	EC Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF).....	49
<b>3</b>	<b>ACTIVITES DE SURVEILLANCE .....</b>	<b>50</b>
3.1	Données de la surveillance microbiologique de la listériose humaine .....	50
3.1.1	Cas de listériose en France.....	50
3.1.1.1	Définition de cas .....	50
3.1.2	Analyse globale des cas de listeriose.....	51
3.1.3	Cas de listériose en France métropolitaine .....	54
3.1.3.1	Distribution temporelle des cas.....	55
3.1.3.2	Distribution des cas selon la forme clinique.....	59

3.1.3.3	Distribution des souches selon le groupe PCR.....	67
3.1.4	Cas de listériose dans les DOM-TOM.....	72
3.1.5	Etude de la résistance aux antibiotiques.....	73
3.1.6	Typage moléculaire des souches par macrorestriction d'ADN.....	74
3.2	Caractérisation des souches d'origine non humaine.....	77
3.2.1	Analyse générale.....	78
3.2.2	Souches isolées d'aliments.....	81
3.2.2.1	Catégories de laboratoires ayant adressé les souches.....	81
3.2.2.2	Nombre de souches et distribution par espèce.....	82
3.2.2.3	Distribution des souches de <i>L. monocytogenes</i> par catégorie d'aliments.....	83
3.2.2.4	Distribution des souches de <i>L. monocytogenes</i> par groupe PCR.....	83
3.2.3	Souches isolées de l'environnement.....	84
3.3	Bilan des investigations, signalements et alertes.....	86
3.3.1	Suspensions d'infections nosocomiales.....	86
3.3.2	Investigation en creche.....	86
3.3.3	Signalements.....	86
3.3.4	Alertes DGAI.....	87
3.3.5	Alerte DGCCRF.....	88
3.3.6	Alerte Européenne.....	88
3.3.7	Enquête des formes neuroméningées.....	88
3.3.8	Conclusion.....	89
<b>4</b>	<b>ACTIVITES D'INFORMATION, DE FORMATION ET DE CONSEIL.....</b>	<b>90</b>
4.1	Centre de documentation.....	90
4.2	Diffusion de l'information sur <i>Listeria</i> et la listériose.....	90
4.2.1	Site Internet.....	90
4.2.2	Cours et conférences sur invitation.....	91
4.2.3	Formation et encadrement.....	91
4.2.4	Demande d'informations et de conseils.....	92
4.3	Expertise.....	93

4.4	Retour d'informations .....	94
<b>5</b>	<b>LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS .....</b>	<b>96</b>
5.1	Publications nationales .....	96
5.2	Publications internationales .....	96
5.3	Communications nationales .....	97
5.4	Communications internationales .....	97
5.5	Conférences sur invitations .....	97
<b>6</b>	<b>PROGRAMME D'ACTIVITE POUR LES ANNEES 2010-2011 .....</b>	<b>98</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSION GENERALE .....</b>	<b>100</b>
	Références citées.....	102





## **RESUME DE L'ANNEE 2009**

En 2009, le nombre de cas de listériose déclarés en France a augmenté par rapport à 2008 (322 cas ; +18%). Cette augmentation concerne notamment les formes materno-néonatales. Il s'agit du nombre de cas de listérioses le plus élevé depuis 1995, et l'augmentation observée depuis 2006 se maintient donc en 2009. Il est prématuré à ce stade de conclure que l'augmentation observée en 2009 par rapport aux trois années précédentes est significative. Il est important de souligner que cette augmentation s'inscrit dans un contexte d'augmentation comparable au niveau européen, sans que la cause en ait été identifiée à ce jour. En lien avec l'AFSSA et l'InVS, le CNRL a participé à la rédaction d'un rapport sur ce sujet (<http://www.afssa.fr/Documents/MIC-Ra-ListerioseAliments.pdf>). Le taux de mortalité de 25 à 30% associé à cette maladie, souligne l'importance de la surveillance de la listériose humaine, domaine dans lequel l'expertise du CNRL est reconnue internationalement. Le CNRL a été sollicité par les autorités sanitaires françaises pour la gestion d'alertes sur des produits contaminés en France et dans des pays tiers ainsi que par les autorités sanitaires autrichiennes dans le cadre d'une épidémie. Il a également aidé des investigateurs algériens et portugais à la mise en place d'un système de surveillance. Le CNR des *Listeria*, devant être à même de poursuivre son activité en cas de déclenchement du plan de pandémie grippale H1N1, s'est préparé à une autonomie de fonctionnement sur 12 semaines en 2009.

Le CNR des *Listeria* poursuit ses efforts afin d'améliorer le diagnostic des cas de listériose, la détection des cas groupés et l'identification de la source de contamination, en lien constant avec l'InVS et les autres partenaires de la cellule *Listeria*. Cette année, le CNRL a optimisé les modalités diagnostiques des gastroentérites à *L. monocytogenes* et approfondi la compréhension de cette forme clinique dont l'incidence est probablement sous-estimée. Le CNRL a également participé à la mise en évidence de l'implication d'une autre espèce de *Listeria*, *L. ivanovii*, dans des cas de listériose humaine (Guillet C. et coll., 2009. Emerg Infect Dis), et a décrit une nouvelle espèce de *Listeria* non pathogène, *Listeria rocourtiae* (Leclercq et coll., 2009. Int J Syst Evol Microbiol).

La caractérisation moléculaire des souches de *Listeria* est primordiale pour l'investigation des cas groupés et des épidémies, ainsi que l'identification du véhicule alimentaire à l'origine des cas humains. Elle permet de plus d'analyser la biodiversité de ce genre bactérien. Cette année, le CNRL, en collaboration avec la Plate-Forme de Génotypage des Pathogènes et Santé Publique (PF8), a mis au point un schéma de caractérisation des souches selon la méthode MLVA (Multi Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis). Il a également conduit une étude phylogénétique par Multilocus Sequence Typing (MLST) à partir de souches originaires des 5 continents, afin d'étudier de façon la plus exhaustive possible la biodiversité et l'évolution de l'espèce *Listeria monocytogenes*.

En lien avec le groupe Microorganismes et barrière de l'hôte, auquel il est rattaché, le CNRL participe également à l'étude de la physiopathologie de la listériose. Par ailleurs, dans le cadre de collaborations scientifiques au sein de l'Institut Pasteur et extérieurs, le CNRL poursuit ses travaux visant (i) à améliorer l'identification et la caractérisation des souches (détection des principaux facteurs de virulence, étude de la biodiversité et de la structure génétique des espèces du genre *Listeria* et de leur évolution), (ii) à mieux comprendre la physiopathologie de la listériose humaine et (iii) 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 à risque : les femmes enceintes et leurs nouveau-nés, les personnes âgées (> 60 ans) 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 (Dalton et coll., 1997 ; Aureli et coll., 2000 ; Ooi et coll., 2005) ;
- un coût élevé associé à la prise en charge des cas individuels, avec hospitalisation systématique et prise en charge médicale spécialisée, souvent en réanimation ;
- une mortalité importante (de 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, probablement 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, 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), et en 2009 en Autriche (Fretz et coll., 2010).

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 un recensement des cas.

La Direction Générale de la Santé (DGS) a mis en place depuis 1982 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 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<sup>er</sup> 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 CNRs.

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, depuis 2008, a intensifié ses relations avec le Laboratoire National de Référence des *Listeria monocytogenes* (LNRI, AFSSA-LERQAP) afin d'optimiser le recueil des informations nécessaires à la surveillance microbiologique nationale de la listériose en France.

Les données du CNRL en matière de surveillance microbiologique sont régulièrement publiées (Courtieu, 1985 et 1986 ; Espaze et coll., 1989, 1990 et 1991 ; Goulet et coll., 2001, 2004, 2005 et 2008; 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, 2006 et 2008). 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, 2002 et 2008 ; 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 renversement de cette tendance avec une ré-augmentation nette de l'incidence à 4,6 cas/million d'habitants qui s'est prolongée en 2007 pour atteindre 5,0 cas/million d'habitants. En 2008, l'incidence était de 4,3 cas/million d'habitants, un chiffre proche de celui de l'année 2006 (Goulet et coll., 2008). Le bilan de 2009 fait état d'une incidence à 5,1 cas/million d'habitants, ce qui est comparable à l'année 2007. S'il existe une discrète augmentation par rapport à l'année 2008, le nombre de cas observés en 2009 reste du même ordre de grandeur que celui observé depuis 2006. 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, et si l'augmentation se poursuit. L'observation dans d'autres pays d'Europe d'une augmentation comparable est plutôt en faveur d'une réelle évolution épidémiologique.

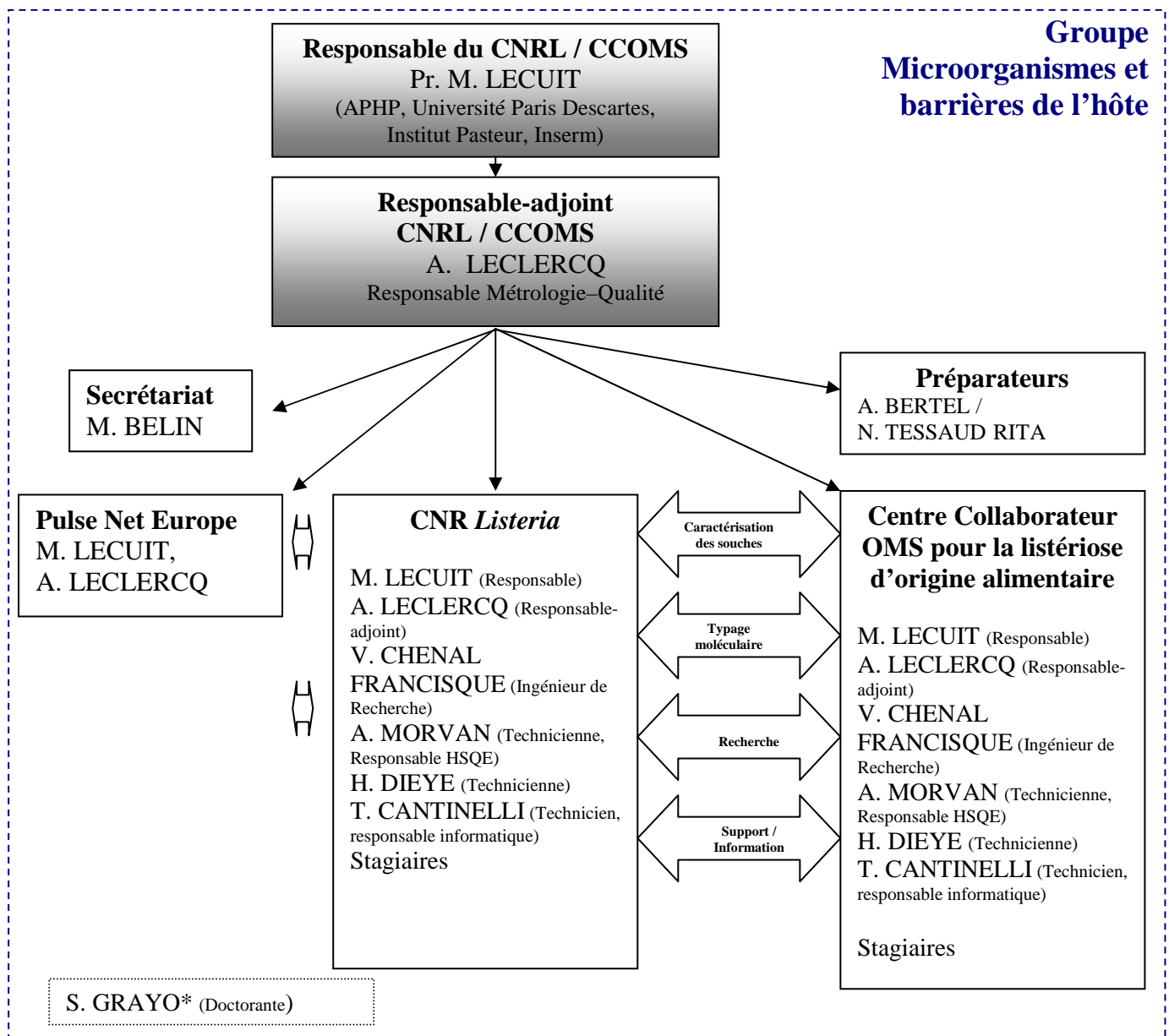
Le laboratoire hébergeant le CNRL est également désigné Centre Collaborateur de l'OMS et participe à la surveillance de cette infection dans les pays qui en font la demande.

## 1.1 PERSONNEL PERMANENT

### 1.1.1 ORGANIGRAMME GENERAL

Le Groupe « 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)**



\* financement Fondation pour la Recherche Médicale, ayant quitté le laboratoire en décembre 2009

## 1.1.2 EFFECTIF

L'effectif du personnel du CNRL est présenté dans le Tableau 1. Une partie de son personnel (préparateurs ou aides de laboratoire) est commun avec le pôle d'identification biologique de la cellule d'intervention d'urgence des risques biologiques (PIB-CIBU). Les cadres assurent également des astreintes à la cellule d'intervention d'urgence des risques biologiques (CIBU). La secrétaire travaille à mi-temps pour le CNRL. Ce poste est crucial au CNRL car il constitue le premier point de contact avec le public et notre réseau de correspondants. En 2009, le secrétariat a participé à l'investigation de cas atypiques de listérioses (recherche dans les archives de cas similaires, suivi des correspondances avec les laboratoires pour recueillir les données clinico-biologiques, etc.).

Marc Lecuit est professeur à l'Université Paris Descartes et praticien hospitalier à l'Hôpital Necker Enfants malades dans le service des maladies infectieuses et tropicales (Centre d'infectiologie Necker-Pasteur). Il bénéficie d'un contrat d'interface Inserm pour hospitalier et dirige à l'Institut Pasteur le groupe Microorganismes et barrières de l'hôte, le CNRL et le CCOMS *Listeria*.

**Tableau 1 : Personnel statutaire de l'Institut Pasteur affecté au CNR des *Listeria***

Nom – Prénom	Libellé Emploi	% Act*.	% Section Bud.**	ETP***
LECLERCQ Alexandre	Cadre A confirmé – Responsable-Adjoint	100,00	70,00	0,70
CHENAL FRANCISQUE Viviane	Ingénieur 2	100,00	100,00	1,00
MORVAN Anne	Technicienne supérieure de laboratoire Échelle 6	100,00	90,00	0,90
CANTINELLI Thomas	Technicien supérieur de laboratoire Échelle 5	100,00	80,00	0,80
DIEYE Hélène (CDD)	Technicienne supérieure de laboratoire Échelle 5	100,00	90,00	0,90
BELIN Martine	Secrétaire Échelle 4	50,00	50,00	0,25
RITA TESSAUD Nathalie	Aide de Laboratoire Échelle 3	80,00	40,00	0,32
BERTEL Arnaud	Aide de Laboratoire Échelle 3	100,00	35,00	0,35
<b>TOTAL Equivalent Temps Plein (ETP)</b>				<b>5</b>

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

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

\*\*\*ETP Equivalent Temps Plein.



→ L'année 2009 n'a pas été marquée par des changements de personnel, hormis le départ de l'étudiante en Doctorat ayant soutenu sa thèse en décembre 2009 (nouveau recrutement en cours).

## **1.2 LOCAUX**

### **Laboratoires et bureaux:**

Le CNR des *Listeria* (CNRL) est hébergé à l'Institut Pasteur en 2009 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 microorganismes 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. Les pièces critiques (collection, etc.) sont sous surveillance de température et ont été incorporées au plan de continuité d'activité de l'Institut Pasteur.

### 1.3 EQUIPEMENT

L'ensemble des équipements scientifiques fait l'objet d'un suivi métrologique (Etalonnage-Cartographie et/ou vérification et, en 2009, d'un suivi continu des températures).

#### *Matériel, équipement utilisés*

- Matériel courant d'un laboratoire réglementaire de confinement L2 de microbiologie classique et de biologie moléculaire,
- 1 poste de sécurité microbiologique,
- 4 étuves,
- 1 four à hybridation,
- 5 réfrigérateurs,
- 2 congélateurs ;
- 1 congélateur -80°C,
- 1 microscope,
- 2 centrifugeuses dont une pour les plaques,
- 3 équipements d'électrophorèse en champs pulsé dont un nouvel équipement en 2009,
- 3 thermocycleurs en point final,
- 2 générateurs et cuves d'électrophorèse,
- 1 balance de précision,
- 1 fax-copieur.

#### *Equipements partagés*

- 2 autoclaves,
- 2 machines à laver la vaisselle,
- 1 autopréparateur de milieux de culture,
- 1 machine à glace,
- 1 balance de précision,
- 1 photocopieuse-scanner

#### *Equipement informatique*

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

- CNR de la coqueluche et CIBU : Accès à un appareil (site) de PCR en temps réel
- 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 ET HYGIENE/SECURITE AU SEIN DU CNRL**

La mise en place du management de la qualité adapté aux missions des CNRs est l'un des objectifs de la Direction Médicale de l'Institut Pasteur pour les CNRs. Le choix définitif du référentiel le plus adapté aux missions des CNRs reste toutefois conditionné aux réflexions en cours tant au niveau de l'InVS que du COFRAC (Comité Français d'accréditation) et de l'Institut Pasteur. La Direction déléguée « Direction déléguée à l'hygiène, la sécurité, la qualité, l'environnement et au développement durable (HSQEDD) » 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 CNRL 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. En 2010, suite au cadre réglementaire de l'accréditation des laboratoires d'analyses médicales, le CNRL sera amené à confirmer comme deuxième intention des résultats de première intention de laboratoires accrédités NF EN ISO 15189. Pour faciliter ses échanges avec ses correspondants, le CNRL doit avoir un système qualité dans la continuité de celui de ses correspondants.

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 étaient depuis en cours de révision pour répondre aux exigences de ce nouveau référentiel.

Depuis 2007, le responsable adjoint au CNRL 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. En 2009 et suite à la réglementation sur l'accréditation des laboratoires d'analyses médicales, le CNRL s'est engagé dans une conformité par rapport au référentiel NF EN ISO 15189 ce qui nécessite une adaptation de son système qualité à ce nouveau référentiel et aux futurs documents de référence du COFRAC en santé humaine.

→ Les lignes d'essais, cœur de l'activité technique du CNRL, qui seront soumises à son 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)
- Electrophorèse en champ pulsé de l'ADN génomique de *Listeria monocytogenes* digéré par l'enzyme de restriction *SmaI* (Méthode interne)

En 2009, le CNRL a participé à l'essai inter-laboratoire pour les essais d'électrophorèse en champ pulsé de l'ADN génomique organisé par le laboratoire communautaire de référence (LCR) des *Listeria monocytogenes*. Le CNRL a également été équipé d'un système de surveillance (avec appel du personnel d'astreinte en cas de non-conformité) en continue des températures de ses incubateurs et des pièces ou équipements de stockage critiques comme les collections de souches.

Outre cette démarche qualité, le CNRL comptabilise dans son personnel le responsable hygiène et sécurité d'un des sites de l'Institut Pasteur. Ce personnel veille au respect quotidien des réglementations en termes d'hygiène et de sécurité au sein du CNRL.

## **1.5 PLAN DE CONTINUITÉ D'ACTIVITÉ**

Face à la pandémie de grippe H1N1, le CNRL a été identifié comme structure devant continuer son activité en cas d'arrêt général des autres activités sur le territoire suite au plan pandémie. De mai à Juillet 2009, le CNRL a mis en place l'organisation nécessaire pour assurer une autonomie de fonctionnement humain, matériels et en source d'énergie sur 12 semaines avec sauvegarde du patrimoine crucial (Collections, etc.). Ceci a nécessité la mise en place de possibilité de télétravail (interface internet).

En outre, les cadres du CNRL ayant chacun des activités (Hospitalière ou CIBU) respectives relatives à la gestion de la pandémie grippale ont été très sollicités. Le laboratoire du CNRL a mis à disposition de la Cellule d'Intervention Biologique d'Urgence une partie de ses locaux techniques pour réaliser le diagnostic par RT-PCR de grippe pandémique, ce qui a nécessité une réorganisation de l'activité du CNRL.

## **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 et biologique pour l'identification et la caractérisation des souches d'origine non humaine, il contribue aux réseaux internationaux de surveillance, à la diffusion de l'information, la veille technologique et au 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 (DGAl) ou de la Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes ou d'investigations autour de cas ou d'autocontrôles. En 2009, des souches alimentaires ont été également envoyées d'hôpitaux et à la demande d'assureurs dans le cadre de contre-expertise d'analyses de laboratoire.

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<sup>®</sup> (AES Laboratoire, France) et gélose au sang de cheval (bioMérieux, France).
- **Confirmation de l'identification au genre et à l'espèce** par microscopie, des tests biochimiques [galerie API-*Listeria*<sup>®</sup> (bioMérieux, France)] et la 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, extrêmement rares en ce qui concerne les souches isolées de patients, font l'objet d'investigations complémentaires appropriées, en fonction de l'expérience phénotypique et moléculaire anciennement acquise par « 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. rocourtia* en 2009, et d'identifier des profils atypiques de séro groupe PCR. Toutes les souches non *Listeria* présentant quelques caractéristiques phénotypiques du genre sont expertisées par cette dernière méthode. Cette analyse est réalisée en partenariat avec l'équipe du Pôle d'identification biologique de la CIBU.

- **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<sup>ème</sup> 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 *Apal* 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 (demandé par la cellule *Listeria* ou l'InVS 3 fois sur une série de souches en 2009 et pour les signalements L09/01, L09/06, L09/08). Ce typage par *SmaI* a été réalisé sur 25% des souches humaines en 2009 contre 30% en 2008 et 2007 et sur 19% des souches totales reçues au CNRL contre 17% en 2008 et 18% en 2007 (à savoir que des souches typées en 2009 étaient des souches réceptionnées en 2008). En cas d'épidémie ou de crise, le CNRL peut multiplier par 2 sa capacité de typage par utilisation des équipements 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 (Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie). Ces antibiogrammes sont effectués sur un panel de 23 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 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 détection de la troncation de la protéine de l'InIA.

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, typage et suivi de contamination sur des sites particuliers. 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 2009, le CNRL a reçu un total de 1476 souches** dont 350 souches d'origine humaine, 810 souches d'origine alimentaire, 114 souches d'origine environnementale dans le cadre d'alertes sanitaires, d'investigations ou de demandes client, 2 souches d'origine vétérinaire, 22 souches sans information, 12 souches de programme de recherche, 6 souches d'un essai interlaboratoire PFGE et 160 souches de pays étrangers dans le cadre des activités du CCOMS (cf. chapitres 2.3.3).

### 2.1.1.2 TECHNIQUES DEVELOPPEES EN 2009

En 2009, le CNRL a poursuivi le développement de nouvelles techniques ou méthodes.

### 2.1.1.3 METHODES EN DEVELOPPEMENT

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

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

*Collaboration avec la plate-forme de génotypage des pathogènes et santé publique PF8 de l'Institut Pasteur (S. Brisse, V. Caro) 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 sélection d'une liste de Variable Number of Tandem Repeats (ou répétition en tandem polymorphe) potentiels pour développer un schéma fiable de typage moléculaire par MLVA (Multiple Loci VNTR Analysis ou Analyse de plusieurs loci 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.

Parallèlement une revue de la littérature a permis d'ajouter d'autres VNTR à l'étude. Pour l'ensemble de ces VNTR, les allèles de 16 souches de *L. monocytogenes*, représentant les complexes clonaux majeurs résultant de l'étude MLST du CNRL sur la biodiversité des souches cliniques françaises, ont été déterminés par électrophorèse capillaire. Pour chaque VNTR la séquence nucléotidique de quelques amplimères a également été vérifiée. 13 VNTR ont alors été sélectionnés et sont maintenant testés sur un plus grand nombre de souches (à la fois sur des souches d'origine humaine et alimentaire liées à une même épidémie et sur des souches isolées de cas sporadiques). Notre but est d'obtenir un schéma MLVA optimal à partir d'un jeu restreint de VNTR. Les performances de ce schéma MLVA, notamment quant à son pouvoir discriminant, seront comparées à celles de trois autres méthodes de typage moléculaire (Géno-sérogroupe, PFGE, MLST). 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 pour la surveillance, notamment dans le cadre de la gestion d'alertes sanitaires ou de signalement.



## ***Identification de Listeria par Maldi-Tof (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time-Of-Flight)***

*Personnes responsables du projet au CNRL : A. Morvan - A. Leclercq - M. Lecuit*

*Collaboration avec la Collection de l'Institut Pasteur et de l'Health Protection Agency (UK)*

La spectrométrie de masse MALDI-TOF permet l'identification des microorganismes par analyse de leur contenu protéique. Cette méthode analyse le déplacement d'entités ioniques dans des champs électromagnétiques. Un mélange matrice-échantillon cocrystallisé sur une surface métallique ou cible est soumis au tir d'un faisceau laser permettant sa désorption et son ionisation. Le temps de vol de ces ions obtenus à partir de bactéries entières est mesuré et permet l'obtention d'un spectre de masse. Parmi les nombreux pics produits, les principaux correspondent à des protéines ribosomales et semblent spécifiques d'espèce. Le but de notre travail est d'évaluer l'intérêt de cette méthode pour l'identification des *Listeria* et comme alternative au séquençage standard des gènes 16S rDNA, en comparant ses performances à celles des galeries API *LISTERIA* (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France) utilisées en routine dans les laboratoires de bactériologie de CHU ou d'Agro-alimentaire. En 2009, ce travail a été initié sur l'ensemble des souches de référence et sera poursuivi en 2010.

En outre, il s'agit pour le CNRL d'aider les constructeurs de ses équipements et les utilisateurs en créant des bases de référence de spectres de référence que les utilisateurs ne peuvent établir faute de nombreux isolats dans leur activité de routine. Il s'agit également de valider cette méthode d'identification pour le genre *Listeria* et d'en connaître ses restrictions éventuelles d'utilisation.

Enfin, outre l'identification des espèces et sous-espèces de *Listeria*, il est envisagé l'étude de la détermination de leur sérovar ou le typage de ces bactéries. Cette technique est dite équivalente à la PFGE pour la caractérisation de clones de *Listeria monocytogenes* et permet de réaliser du génotypage de polymorphismes ponctuels (SNPs).

### **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 sérodiagnostic 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. En outre, cette validation de méthodes pourra servir dans le cadre des démarches d'accréditation des laboratoires d'analyses médicales.

Le CNRL n'est pas un laboratoire d'analyse médicale et ne reçoit donc pas actuellement de prélèvements biologiques humains dans un objectif de diagnostic de première intention. En conséquence, il ne dispose 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 participé à de mettre en place une étude prospective cas-témoins, décrite ci-dessous, permettant de recueillir toutes les données cliniques de patients atteints de listériose et de patients contrôle, mais également les échantillons biologiques issus de ces patients, afin notamment de constituer une bibliothèque permettant d'évaluer ces outils diagnostiques.

#### **2.1.1.4.1.1 PROJET MONALISA**

Projet MONALISA : Multicentric Observational National Analysis of LIsteriosis and *Listeria*

Cf <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01520597>

#### **2.1.1.4.2 EVALUATION DU MILIEU RAPID L.MONO™ ET DU TEST DE CONFIRMATION EN 6H**

Afin d'optimiser l'identification de l'espèce *L. monocytogenes* (Différenciation *L. monocytogenes* de *L. ivanovii*), 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™ et a été validée en 2008 par le CNRL. En 2009, un système d'identification rapide « Rhamnose test » en 6 heures, basé sur l'utilisation du Rhamnose par *L. monocytogenes* et d'un activateur de croissance commercialisé par la firme BioRad (Marnes la Coquette, France), à partir des colonies caractéristiques sur la gélose chromogène Rapid'L. Mono (BioRad) basée sur l'utilisation du xylose et de la PIPLC a été testé.

En étudiant sa collection et en caractérisant à nouveau les souches historiquement rhamnose négative, 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 CNRL a testé en 2008 un premier test rapide d'identification ALOA-Confirmation™ puis sur les mêmes souches un second test d'identification rapide de *L. monocytogenes* « Rhamnose test » commercialisé par BioRad en 2009. Le but est de savoir si les deux tests sont équivalents ou non pour l'identification de souches rhamnose négative. Les données de cette étude du CNRL sont en cours d'études et de confirmation par les industriels concernés. Ceci s'inscrit dans la démarche du CNRL

d'optimisation de l'identification des *Listeria* sur un ensemble de 3 tests phénotypiques et sur un test unique mais fiable pour *L. monocytogenes*.

Cependant, compte tenu de la rareté de ces souches, les laboratoires médicaux pourraient optimiser leur identification par une simple gélose d'identification type ALOA Confirmation™ puisqu'environ 8 souches peuvent être testées simultanément par repiquage ou par le test rapide BioRad.

## 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 en situation épidémique (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.

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.

En partenariat avec le CDC d'Atlanta, en 2009, il a incorporé avant publication la nouvelle espèce de *Listeria marthii* dans sa collection et a pu actualiser ses schémas d'identification et de caractérisation. Des souches du genre *Listeria* et de l'espèce *L. monocytogenes* ayant des propriétés originales 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 EN ISO 17025 et certifiée ISO9001 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.

### **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 9 espèces et sous-espèces du genre *Listeria* (*L. monocytogenes*, *L. ivanovii* subsp. *ivanovii*, *L. ivanovii* subsp. *londoniensis*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. grayi*, *L. rocourtiae* et *L. marthii*) 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 de 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 105.000 souches à la fin de l'année 2009. Ces souches sont d'origine clinique, environnementale et alimentaire ainsi que vétérinaire. La grande majorité des souches a été isolée depuis 1992. Néanmoins, le CNRL conserve certaines souches isolées entre 1987 et 1992 provenant de la collection du CNRL alors hébergé au CHU de Nantes. Le CNRL possède également des clones épidémiques comme celles de l'épidémie de 1992 qui sont des souches précieuses pour la validation de système de typage moléculaire.

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

- *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. La première souche isolée de *Listeria* en 1921 est conservée dans cette collection.

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*. 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 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 2009 n'a été effectuée. Chaque sérum représenterait un coût annuel de production de 800 euros. Une production annuelle des sera pour les *Listeria* représenterait 25% du budget de fonctionnement du CNRL.

Le CNRL détient également l'ensemble des sérums Denka Seiken commerciaux de sérotypage des *Listeria monocytogenes*.

### **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 2009, un envoi a été réalisé sous MTA (Material Transfert Agreement) auprès du LNR d'Angleterre (Health Protection Agency Centre for infections) suite à l'isolement d'une souche de *L. monocytogenes* d'une patiente anglaise ayant séjourné en France.

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 10 souches dans le cas de collaborations sur des facteurs de virulence de *L. monocytogenes*.

→ En 2009, le CNRL a envoyé 2 souches d'alertes produits ou de plan de surveillance et 322 souches d'alertes produits au LNRI (Laboratoire National de référence des *Listeria monocytogenes*).

→ En 2009, le CNRL a envoyé :

- une souche au Laboratoire d'études des produits de la pêche de l'AFSSA de Boulogne-sur-Mer afin de réaliser des challenges tests conformément au règlement EC 2073/2005 à la demande d'un industriel français de l'agro-alimentaire et
- deux souches isolées de beurres à l'AFSSA LERQAP de Maisons-Alfort afin de réaliser une étude de cinétique de croissance de *L. monocytogenes* dans le beurre et les margarines.

### **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.

En 2009, le CNRL a entrepris des collaborations pour valoriser scientifiquement et dans un but de santé publique ces collections par l'intermédiaire de MTA avec des équipes de chercheurs.

## 2.1.3 TECHNIQUES RECOMMANDÉES PAR LE CNRL

### 2.1.3.1 RECOMMANDATIONS GÉNÉRALES

#### 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, 2008b).

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, 2009a) 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, supplémentée 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.
- La méthode DIATHEVA (Fano, Italie) qui est un ELISA commercial pour la détection des IgG anti-LLO dans le sérum humain et le plasma. Ce kit n'a pas encore été évalué d'après la littérature.

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

Le CNRL ne peut formuler de recommandations, faute d'études prospectives sur de larges cohortes de patients décrivant les performances des tests de détection moléculaire de *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](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 AFNOR certification (Tableaux 2 et 3) disponibles sur le site : <http://www.afnor-validation.org/afnor-validation-agroalimentaire/agroalimentaire.html>.

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 AFNOR certification en mars 2010 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 SCIENTIFIC
Transia Plate <i>Listeria</i>	Tests immuno-enzymatiques Détection des <i>Listeria</i> spp.	BIOCONTROL SYSTEMS
TRANSIA STRIP <i>Listeria</i>	Tests immunologiques Détection des <i>Listeria</i> spp.	BIOCONTROL SYSTEMS
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 AFNOR certification en mars 2010 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 Thermofisher Scientific
<i>Listeria</i> Precis™	Milieux de culture Dénombrement des <i>Listeria monocytogenes</i>	OXOID Thermofisher Scientific
Compass <i>Listeria</i> Agar	Milieux de culture Détection des <i>Listeria monocytogenes</i>	SOLABIA / Division BOKAR DIAGNOSTICS
Compass <i>Listeria</i> Agar dénombrement	Milieux de culture Dénombrement des <i>Listeria monocytogenes</i>	SOLABIA / Division BOKAR DIAGNOSTIC

**Tableau 3 (suite)**

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	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
Vidas <i>Listeria monocytogenes</i> Xpress (VIDAS LMX)	Tests immuno-enzymatiques Détection des <i>Listeria monocytogenes</i>	BIOMERIEUX
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 2.1.1.4.

#### **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<sup>®</sup> (Epiconcept) est utilisé depuis le 1er janvier 2005 et a fait 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<sup>®</sup> permet l’anonymisation des données, leur archivage ainsi qu’une meilleure traçabilité. Le logiciel LAGON<sup>®</sup> a été optimisé en 2008 pour permettre 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 5.1 (Applied Maths, Belgique) permettant l’analyse et le stockage des profils de macrorestriction dans les dossiers des souches.

Le CNRL possède une base de données des profils de macrorestriction des souches réceptionnées au CNRL depuis 2005 qui comporte outre les 11.000 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.

En 2009, l’InVS a financé le transfert des données antérieures au 1<sup>er</sup> janvier 2005 dans la base actuelle de données Bionumerics. Cette base de données permettra de suivre l’évolution des profils de macrorestriction d’ADN au cours du temps, de détecter l’apparition de nouveaux clones indigènes et des travaux de modélisation mathématique des signalements et d’apparition/disparition des clones majeurs des souches d’origine humaine. Le travail financé consiste à encoder dans Bionumerics l’ensemble des profils actuellement conservés en archive papier et d’y adjoindre des données cliniques. Une difficulté technique pour la fusion des bases de données est l’utilisation de marqueur PFGE de référence de poids moléculaires différents avant et après 2005. En outre, la base actuelle possède un haut niveau de qualité général (Expertise de la base de données en 2009 par B. Pot de Bionumerics) et cette fusion ne doit pas en altérer les performances actuelles pour ne pas affecter la surveillance nationale. Un travail équivalent serait nécessaire pour la base de données Lagon afin de disposer dans une même base de l’ensemble des données cliniques et des souches depuis la création du CNRL à l’Institut

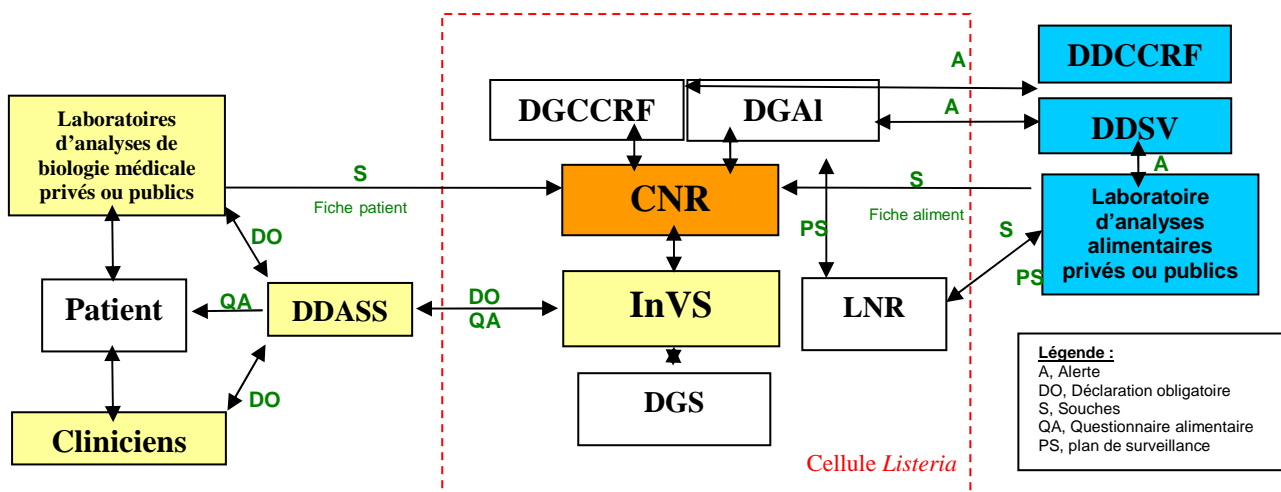
Pasteur.

## 2.2 SURVEILLANCE DE LA LISTERIOSE HUMAINE EN FRANCE

Une des missions clés du CNRL est une 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 effectuée 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.

Ainsi, si on se fonde sur les catégories du chapitre 2.1.2.1., les circuits des souches entre CNRL et LNRI sont les suivants :

- Catégories 1 et 2 : souches transmises directement au CNRL
- Catégorie 3 : souches transmises directement au CNRL. Le CNRL s'engage à envoyer les souches, éventuellement de façon groupée, à intervalles réguliers (tous les deux mois) au LNRI avec les commémoratifs (voir également le paragraphe « Echange de profils » ci-dessous). Lorsque le LNRI reçoit des souches de cette catégorie, il les envoie au CNRL.
- Catégorie 4 : ces souches sont adressées au LNRI. Si l'isolement réalisé dans le cadre d'un plan fait partie d'une alerte produit le LNRI se charge d'envoyer la souche immédiatement au CNRL. Les profils PFGE de ces souches ne rentrent donc pas dans la surveillance nationale de la listériose.
- Catégorie 5 : ces souches appartiennent aux professionnels qui réalisent les autocontrôles. Si ces souches sont à l'origine d'une alerte produit ou sont impliquées dans une investigation autour de cas humains, le laboratoire est sollicité pour envoyer ces souches directement au CNRL.
- Catégorie 6 : Si le CNRL reçoit des souches de cette catégorie, il les transmet au LNRI.

## **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 2009, 360 souches d'origine humaine ont été reçues, concernant 317 cas diagnostiqués par des laboratoires de France métropolitaine (plus 1 cas retenu par l'InVS sans souche associée) 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 2009 et inclut nécessairement des souches reçues au CNRL avant mi-février 2010 en raison des délais d'isolement et d'envoi des souches (s'étendant habituellement jusqu'au mois d'Avril).



## 2.2.2 SURVEILLANCE ET SIGNALEMENT

La surveillance régulière du nombre et des caractéristiques microbiologiques (séovar, 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 groupés 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 3 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 isolées 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. En 2008, l'InVS a sollicité le CNRL pour estimer les conséquences du passage de 14 semaines à 6 semaines pour la définition du signalement, et évaluer si ce changement n'engendrait pas leur fermeture trop rapide, résultant ainsi en une réouverture fréquente après un court laps de temps. Cette étude reste en cours et le CNRL a mis en place un outil informatique permettant de simuler une variation de la durée du signalement et en évaluer les effets.

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 2009, l'InVS a financé l'interconnexion entre les bases du CNRL et du LNRI. Ce travail a été finalisé sous l'égide du CNRL. Ainsi, chaque semaine de surveillance, les deux structures peuvent échanger des profils tout en respectant les exigences de la CNIL et contribuer à l'exhaustivité de la surveillance nationale.

↳ En 2009, 11 signalements ont été investigués (cf. chapitre 3.3.3.).

### **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 23 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  $\beta$ -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 2009 sont présentés dans le chapitre 3.1.1.

## **2.2.6 DETECTION ET ANALYSE DES INFECTIONS NOSOCOMIALES**

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

Plus rarement, de telles situations ont été suspectées dans des services d'hospitalisation d'adultes

lorsque plusieurs patients ont développé une listériose dans une période courte ou lorsque *L. monocytogenes* a été détectée dans des aliments servis à des patients hospitalisés depuis plusieurs semaines (Elsner et coll., 1997 ; Stamm et coll., 1982).

↳ En 2009, ce mode de transmission a été suspecté à 3 reprises. Cependant, un seul épisode d'infection nosocomiale a pu être formellement prouvé (cf. chapitre 3.3.1.).

## **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, possède des DOM-TOM dans le monde par rapport à d'autres pays, les citoyens français circulent en France, en Europe et dans le monde, ceci implique de ne pas cantonner la surveillance de la listériose et des *Listeria* à la France métropolitaine.

### **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.

En 2009, le CNRL et le CCOMS ont participé à l'essai interlaboratoire concernant la PFGE, organisé par le LCR.

### **2.3.2 EUROPEAN CENTER FOR DISEASES CONTROL: ECDC**

En 2009, le CNRL et l'InVS ont participé à la deuxième 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.

En 2009, le CNRL a participé avec l'InVS à la communication des données sur les souches et cas humains pour la base de données européennes permettant la surveillance des maladies infectieuses au niveau européen (TESSY : European Surveillance System).

En 2009, le CNRL a participé à une enquête pour l'ECDC sur son activité et les méthodes employées pour la surveillance microbiologique des *Listeria* et a expertisé le rapport annuel de l'ECDC sur les données européennes de 2008.

### **2.3.3 CENTRE COLLABORATEUR OMS (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 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. En 2009, le CCOMS a continué son aide envers ce stagiaire et a accueilli un stagiaire algérien (Dr R. Drali, Institut Pasteur d'Alger) dans l'objectif de l'aider à mettre en place une structure de surveillance en Algérie.
- évalue des Risques microbiologiques (MRA) et listériose ;
- recueille des données sur la listériose et *Listeria monocytogenes* dans les aliments pour le site Web MRA ;
- apporte son concours à l'OMS dans le cadre des activités MRA FAO/OMS ;

- encourage la recherche sur les lacunes actuelles des connaissances, en particulier concernant les principales filières alimentaires contribuant à la listériose humaine ;
- travaille en étroite collaboration avec les autres centres collaborateurs OMS (CC) en matière de salubrité des aliments, de surveillance des maladies d'origine alimentaire, d'évaluation du risque microbiologique et de typage des agents pathogènes transmis par les aliments ;
- renforce les capacités techniques de pays en difficulté sur cette thématique
- organise des formations de niveau international et y participe ;
- participe activement à la collecte et à la diffusion des informations ;
- participe à l'impact des *Listeria* dans le Bioterrorisme : collabore avec l'OMS en matière de préparation et d'action dans le domaine du bioterrorisme et recueille, pour le compte de l'OMS, des informations sur le bioterrorisme en ce qui concerne *Listeria monocytogenes* dans l'alimentation.

En 2009, le CCOMS a reçu 160 souches adressées par 9 laboratoires étrangers (contre 218 en 2008 et 232 en 2007) se décomposant en :

- 2 souches humaines polonaises dans le cadre de l'investigation sur un patient supposé contaminé par *Listeria grayi*, mais les souches étaient des *Nocardia* ;
- 2 souches humaines dans le cadre de l'investigation d'une épidémie en Autriche ;
- 5 souches humaines provenant d'un laboratoire italien d'analyses médicales ;
- 58 souches alimentaires d'Algérie (172 souches réceptionnées) 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 aliments et leurs liens avec les souches humaines ;
- 50 souches alimentaires de Colombie dans le cadre de la surveillance colombienne de la listériose ;
- 5 souches du CDC d'Atlanta dans le cadre de l'étude de la nouvelle espèce *L. marthii* ;
- 15 souches alimentaires d'Italie dans le cadre de l'alerte produit communautaire 2009/458 ;
- 16 souches alimentaires et 5 souches humaines de Tunisie dans le cadre d'une enquête sur la listériose en Tunisie ;
- 2 souches alimentaires du Sénégal dans le cadre des prémices d'une surveillance de la listériose dans ce pays.

↪ En 2009, le CCOMS a apporté son aide et son expertise à la Colombie.

↪ En 2009, le CCOMS a participé dans le cadre d'une épidémie autrichienne à une investigation pour le CNR/LNR binational Autriche/Allemagne dans le cadre du typage moléculaire de souches et d'interprétation de profils, l'identification possible de l'aliment contaminant et la fréquence des pulsotypes des souches humaines de cette épidémie. (Fretz R. et al. 2009. Listeriosis outbreak caused by acid curd cheese 'Quargel', Austria and Germany 2009. Eurosurveillance, Volume 15, Issue 5).

Le CCOMS a poursuivi sa surveillance des épidémies canadiennes de 2008 avec le rappel de produits en 2009 de la firme Mapple Leaf et la veille sur le territoire de Saint pierre et Miquelon, proche du Canada et ravitaillé en denrées alimentaires par ce dernier.

Le CCOMS possède un site web à l'adresse :

<http://www.pasteur.fr/cnr/listeria>

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

↳ En 2009, le laboratoire a déposé sa candidature pour une nouvelle mandature comme CCOMS *Listeria*.

↳ En 2009, l'OMS a sollicité notre laboratoire au sujet d'une extension du réseau **Global Foodborne Infections Network** à *Listeria monocytogenes* (<http://www.who.int/gfn>).

### 2.3.4 PULSENET EUROPE

Dans le cadre du 6<sup>ème</sup> 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.

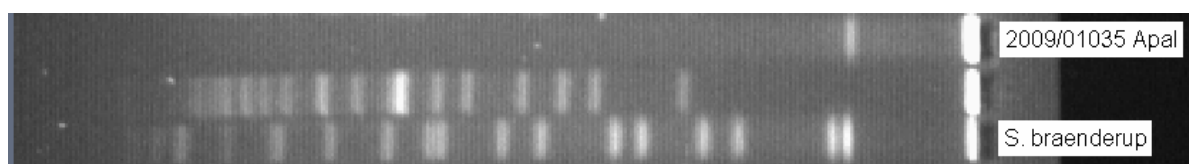
En 2009, le CNRL a effectué ses analyses de macrorestriction d'ADN sous certificat EQAS pour l'assurance-qualité de ces profils de macrorestriction d'ADN génomique de *L. monocytogenes* au moyen des enzymes de restriction *AscI* et *ApaI*.

Le CNRL a continué de proposer 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. En outre, l'étude sur la contamination européenne par *L. monocytogenes* des denrées prêtes à être consommées lancée en 2010 par la Commission Européenne DG SANCO dans les Etats membres est l'occasion de relancer Pulsenet Europe afin de comparer les souches alimentaires provenant de denrées prêtes à être consommées entre elles et avec les souches humaines isolées en 2010.



Le CNRL/CCOMS est en lien avec le CDC d'Atlanta afin d'optimiser les méthodes PFGE (Nouveau protocole publié fin 2009) et de partager des données sur des difficultés techniques comme par exemple l'apparition en France d'une souche donnant des profils *ApalI* atypiques, une seule bande (figure 3). Face à ce nouveau profil constaté il y a 10 ans au Canada et aux USA d'après le CDC, le protocole PFGE est en cours d'évolution pour contourner ce problème technique.

**Figure 3 :** Profil atypique apparu en 2009 ne comportant qu'une seule bande en PFGE *ApalI*. *S. braenderup* est utilisée pour générer le marqueur de poids moléculaires.



### 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.

Suite à la demande en 2007 du CNRL, les autres membres (DGAI, DGCCRF, InVS) de la Cellule *Listeria* communiquent au CNRL/CCOMS les informations du réseau RASFF de l'Union européenne.

En 2009, le CNRL a suivi deux alertes RASFF sur des fromages (Cf. chapitre 3.3.6.).

Ce système RASFF est complété au niveau mondial par le réseau INFOSAN de l'OMS où le CNR/CCOMS est contacté pour expertiser certaines alertes avant leur envoi sur le réseau internationale. A ce titre, le CNRL fait une veille web sur la listériose et les *Listeria* afin d'en informer le cas échéant ses partenaires de la surveillance nationale de la listériose en France.

## 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 ( $\leq 28$  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 risque<sup>1</sup>, 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 2009 et la souche caractérisée par le CNRL. Ceci inclut donc les souches reçues au cours du premier trimestre 2010 compte tenu des retards dans l'envoi des souches au CNRL. En 2009, un

---

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

cas a été retenu par l'InVS alors que le CNRL a reçu une souche non viable donc sans souche *L. monocytogenes* associé. Ce cas ne sera pas retenu dans l'analyse du CNRL.

### 3.1.2 ANALYSE GLOBALE DES CAS DE LISTERIOSE

#### *Nombre total de cas*

**En 2009, le CNRL a reçu 360 souches représentant 327 cas (hors 33 doublons) de suspicion de listériose.**

Pour 5 cas (1,5 % comme en 2008), le CNRL n'a pas confirmé le diagnostic de listériose puisqu'il s'agissait de souches n'appartenant pas au genre *Listeria* (provenant d'une infection sur prothèse de hanche, d'une infection urinaire, d'un placenta d'une femme enceinte) ou de souches non viables (provenant d'une hémoculture et d'un échantillon de selle).

En 2009, 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 transférés au service de microbiologie de l'hôpital Necker-Enfants Malades). En revanche, 2 selles avec suspicion de présence de *L. monocytogenes* ont été expertisées par le CNRL et aucune ne fut positive à *L. monocytogenes*. L'analyse de selles a été requise dans le cadre de la suspicion de porteurs sains lors d'investigation dans des contaminations d'ateliers de charcuterie suite à la sollicitation des médecins du travail.

**Au total, le CNRL retient donc 322 cas de listériose pour l'année 2009 au jour du traitement statistique réalisé pour ce rapport (dont, d'après les cas recensés par l'InVS de la déclaration obligatoire, 1 cas de différence sans souche associée et 5 souches humaines de 2009 non encore réceptionnées au CNRL).** Ces cas étaient répartis en 317 cas en provenance de France métropolitaine et 5 cas en provenance des Départements et Territoire d'Outre-mer (DOM-TOM) [Martinique (2), Réunion (2), Guadeloupe (1)]. Les 5 cas des DOM-TOM sont analysés dans le chapitre 3.1.4. Il est à noter qu'une patiente anglaise a été hospitalisée pour une listériose sur le territoire français métropolitain et a été comptabilisée dans les cas de France métropolitaine (Cf. Chapitre 2.1.2.4.).

#### *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 (Déclaration Obligatoire) et la centralisation du recueil des souches au CNRL sur la base du volontariat d'un réseau de microbiologistes. En 2009, un point a été effectué chaque semestre entre les déclarations obligatoires envoyées par les laboratoires à l'InVS et les souches reçues au CNRL afin de maintenir un taux optimal d'exhaustivité et mobiliser les DASS pour la récupération des souches dans un objectif épidémiologique.

La comparaison des 2 systèmes (CNRL/InVS) en 2009 montre **un taux d'exhaustivité de 99 %** (comme en 2008) de l'envoi des souches par rapport à l'ensemble des cas recensés par les 2

systèmes. Cependant dans 1 cas, la souche envoyée au CNRL n'était pas viable mais le cas a été retenu par l'InVS. Le laboratoire expéditeur n'a pas pu la communiquer à nouveau au CNRL. La relance des biologistes par l'InVS a permis de récupérer des souches dont la plus récente a été reçue en Février 2009.

### ***Laboratoires expéditeurs***

Parmi les 327 souches qui ont été envoyées pour suspicion de listériose, 297 (91 %) proviennent de laboratoires de centres hospitaliers et 30 (9 %) de laboratoires privés. La proportion d'origine hospitalière des souches est la même qu'en 2008.

- 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 8 jours (contre 6,6 en 2008, 10,3 jours en 2007 en 2004) [compris entre 1 et 140 jours] (Figure 4).

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. La dégradation constatée en 2009 provient que lors de doutes sur l'identification à l'espèce *monocytogenes* le laboratoire pousse les investigations car il doit effectuer la DO alors qu'il pourrait directement envoyer la souche au CNRL. La 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 maintient cependant des délais raisonnables d'acheminement au CNRL. Cependant ce transporteur n'a pas comme client l'ensemble des laboratoires d'analyses médicales français.

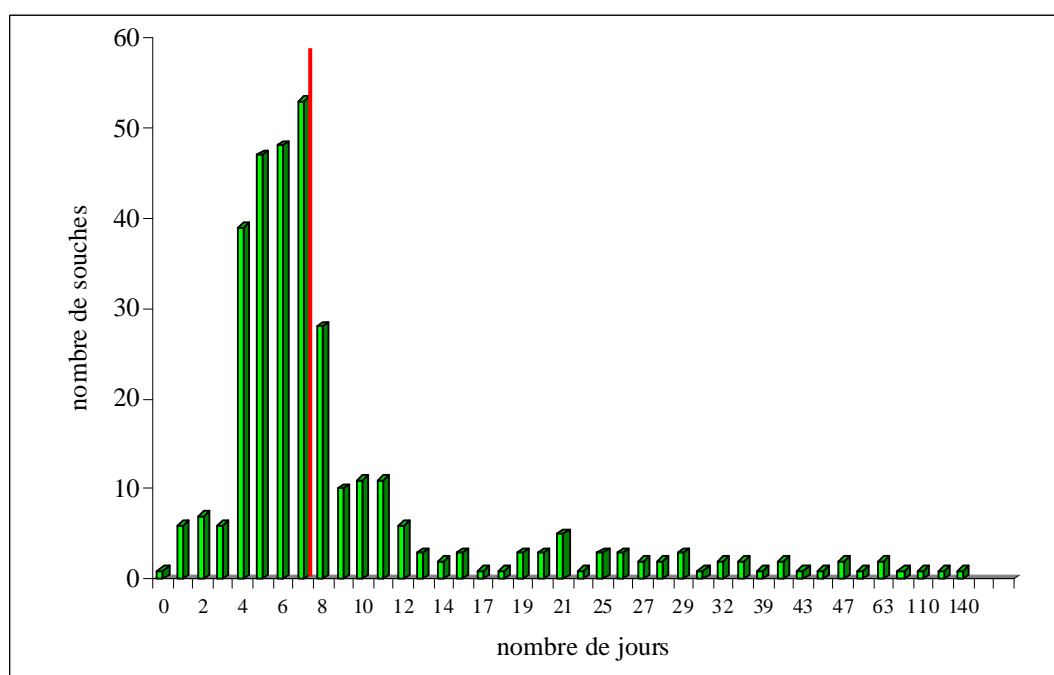
- Le délai moyen entre la réception de la souche au CNRL et l'envoi du rapport d'essai (contenant les résultats d'identification biochimique et la détermination du sérovar ou du groupe PCR) a été de 8 jours en 2009 contre 8,7 en 2008 [compris entre 1 et 63 jours (Figure 5)]. La sérotypie ayant été remplacée 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 analytiques). Le respect de ces délais est devenu une des priorités du CNRL. Pour 95% des souches comme en 2009 (contre 90% en 2008), 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 la contamination de certaines souches, 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.

↳ En cas d'urgence ou de demandes de la Cellule *Listeria*, le délai moyen en 2009 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

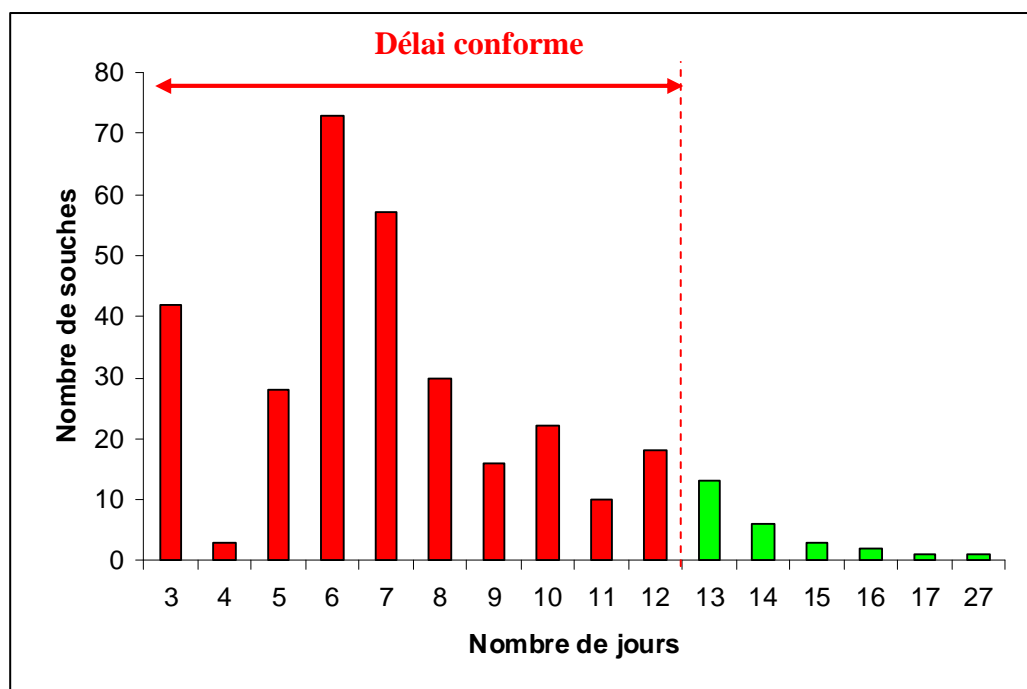
souche réceptionnée contre 3 jours en routine et de 5 jours pour les résultats de macrorestriction d'ADN contre 12 jours en routine. Le CNRL a eu recours à ces analyses accélérées à la demande de l'InVS qui sont confirmées par une analyse de référence réalisée en parallèle.

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 cependant pas apparue comme limitante en 2009, contrairement aux années antérieures, car un transporteur, après négociation avec l'Institut Pasteur, a facilité la remontée des souches vers le CNRL.

**Figure 4** : Distribution des souches d'origine humaine isolées en 2009 selon le délai entre le prélèvement et la réception au CNRL (en rouge, la médiane).



**Figure 5** : Distribution des souches isolées en 2009 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 2009 par le CNRL provenant de la France métropolitaine est de 317.** Après une augmentation depuis 2005 comme dans de nombreux pays européens, le nombre de cas de listériose diagnostiqués en 2009 est proche de celui de 2007 (299 cas) sans qu'aucun épisode épidémique n'ait été détecté (Figure 6). Ce nombre de cas recensés par le CNRL est le plus élevé depuis 1996. En 2009, le taux d'incidence moyen des cas de listériose sporadique était de 5,1 cas par million d'habitants (contre 4,6 cas par million d'habitants en 2006 ; 5 cas par million d'habitants en 2007 et 4,3 cas par million d'habitants en 2008). En 2009, il s'agit donc d'un niveau proche de l'incidence de 2007.

Le nombre de souches associées à un signalement est constant 87 (27%) [Contre 24% en 2008 et 20% en 2007] bien que le nombre de signalements (11) en 2009 est supérieur à celui (9) de 2008. Cependant, aucune source commune n'a pu être identifiée pour ces 11 signalements.

<b>2009 :</b>	<b>317 cas</b>
<b>2008 :</b>	<b>272 cas</b>
<b>2007 :</b>	<b>299 cas</b>
<b>2006 :</b>	<b>272 cas</b>
<b>2005 :</b>	<b>206 cas</b>
<b>2004 :</b>	<b>231 cas</b>
<b>2003 :</b>	<b>191 cas</b>
<b>2002 :</b>	<b>211 cas</b> dont 11 liés à la consommation de saucisse à tartiner et 3 liés à la consommation de mortadelle
<b>2001 :</b>	<b>181 cas</b>
<b>2000 :</b>	<b>245 cas</b> , dont 3 liés à la consommation de rillettes et 25 liés à la consommation de langue de porc en gelée
<b>1999 :</b>	<b>244 cas</b> , dont 7 liés à la consommation de rillettes et 7 liés à la consommation de langue de porc en gelée
<b>1998 :</b>	<b>229 cas</b>
<b>1997 :</b>	<b>242 cas</b> , dont 14 liés à la consommation de fromages à pâte molle
<b>1996 :</b>	<b>220 cas</b>
<b>1995 :</b>	<b>338 cas</b> , dont 37 liés à la consommation de fromage à pâte molle
<b>1994 :</b>	<b>336 cas</b>
<b>1993 :</b>	<b>489 cas</b> , dont 38 liés à la consommation de rillettes
<b>1992 :</b>	<b>734 cas</b> , dont 276 liés à la consommation de langue de porc en gelée
<b>1990 :</b>	<b>306 cas</b>
<b>1989 :</b>	<b>409 cas</b>
<b>1988 :</b>	<b>397 cas</b>
<b>1987 :</b>	<b>366 cas</b>

### **3.1.3.1 DISTRIBUTION TEMPORELLE DES CAS**

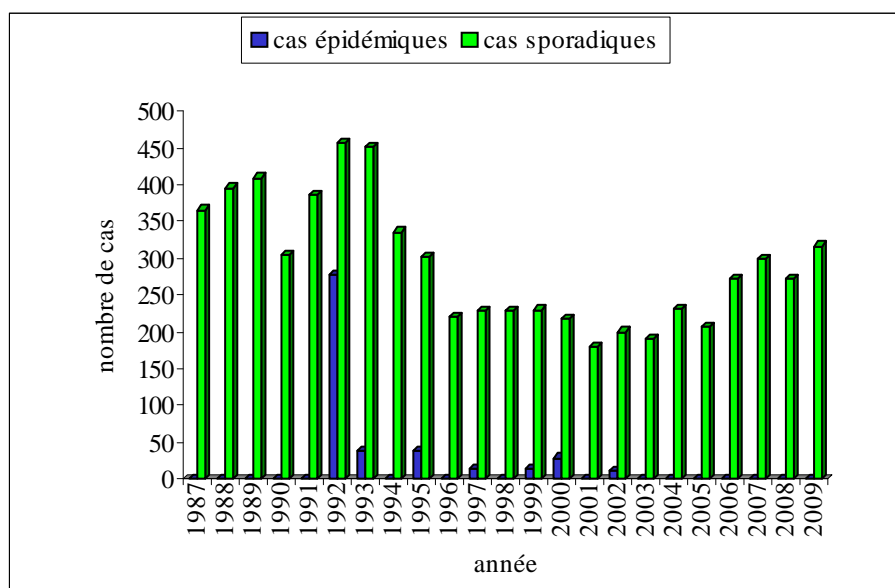
La distribution mensuelle et trimestrielle des cas sporadiques est représentée dans les figures 7 et 8.

Le plus grand nombre de cas a été observé durant le troisième trimestre et notamment pour les mois d’Août (35 cas) et de Septembre (33 cas) comme en 2007, alors qu’il s’agissait de Juillet et Août en 2008.

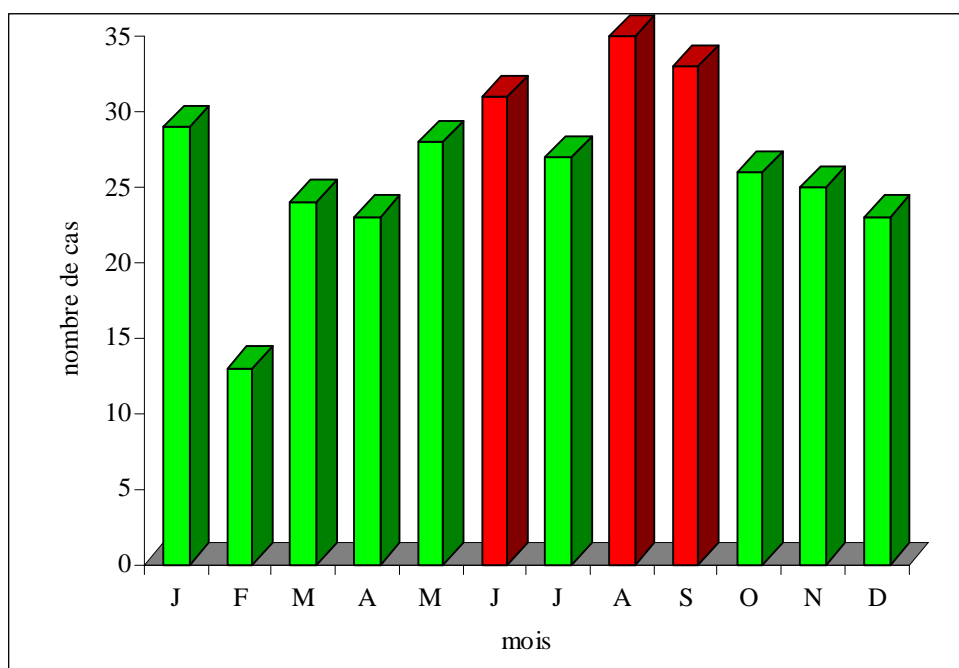
La distribution temporelle des cas sur le premier semestre 2009 a évolué par rapport à l’année 2008 puisque les mois de Janvier (29 cas) et de Juin (31 cas) présentent un fort nombre de cas alors qu’il s’agissait du mois de mai en 2008.

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 6 :** Nombre annuel de cas de listériose en France métropolitaine depuis 1987.

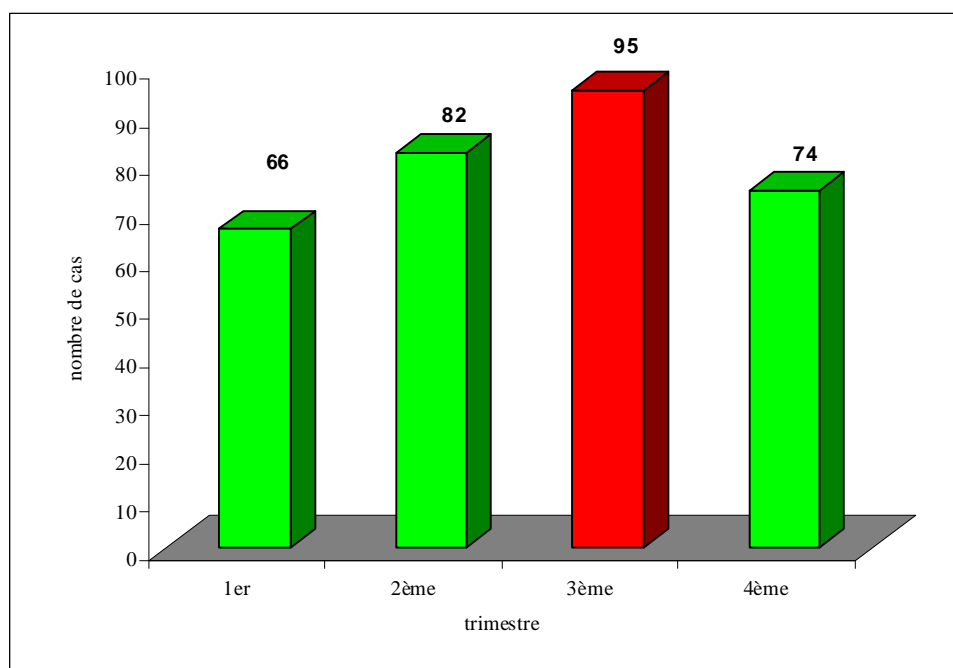


**Figure 7 :** Distribution mensuelle des cas sporadiques de listériose en France métropolitaine en 2009.

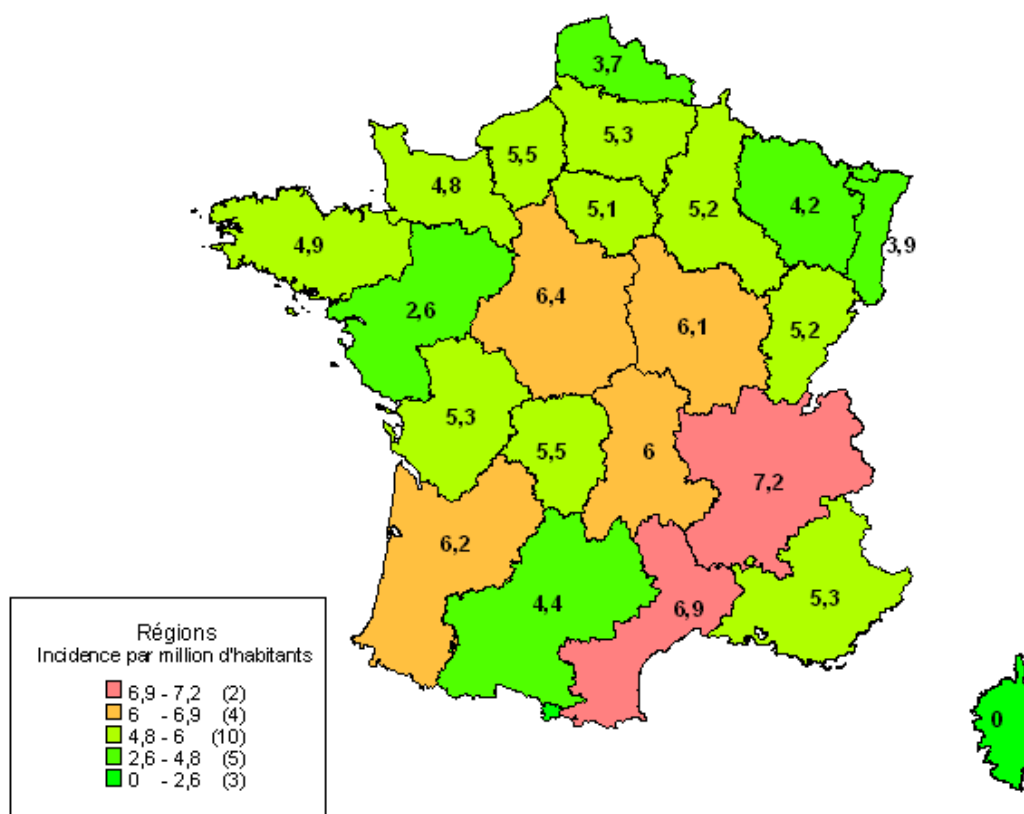




**Figure 8 :** Distribution trimestrielle des cas sporadiques de listériose en France métropolitaine en 2009.



**Figure 9 :** Incidence régionale des cas sporadiques de listériose en 2009.



## Distribution géographique des cas

La distribution géographique du nombre de cas et des incidences est représentée dans la figure 9 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 ( $7/10^6$ ), le Languedoc ( $7/10^6$ ), le Centre ( $6/10^6$ ) et l'Aquitaine ( $6/10^6$ ).

- La région caractérisée par l'incidence la plus basse est la Corse ( $0/10^6$ ).

- Les régions caractérisées par le plus grand nombre de cas, en valeur absolue, sont Ile-de-France (58) et Rhône-Alpes (43), et les mêmes qu'en 2007 et 2008. Les régions caractérisées par les plus faibles nombres de cas, en valeur absolue, sont la Corse (0) et le Limousin (4).

### *Par département*

- Les départements caractérisés par les incidences les plus élevées sont la Lozère ( $26/10^6$ ) et l'Ardèche ( $20/10^6$ ).

- Les départements caractérisés par les incidences les plus basses sont la Vendée ( $1,7/10^6$ ) et la Haute-Garonne ( $1,8/10^6$ ) et 13 départements pour lesquels l'incidence est nulle (04-05-11-15-39-40-52-61-65-72-74-2A-2B).

Les départements caractérisés par les plus grands nombres de cas, en valeur absolue, sont Paris (20) et l'Isère (13). Les départements caractérisés par les plus faibles nombres de cas, en valeur absolue, soit 1 cas sont : le territoire de Belfort, les Vosges, la Vienne, la Vendée, la Somme, la Savoie, la Haute-Saône, la Nièvre, la Meuse, la Mayenne, le Lot, le Gers, l'Eure et Loire, la Dordogne, la Creuse, et la Corrèze.

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 2009 ne sont pas forcément les mêmes que ceux qui étaient épargnés en 2008 sauf les départements 04, 05, 11, 39, 2B. De même, les départements pour lesquels l'incidence en 2009 était élevée ne sont pas ceux constatés en 2008.

Cependant, on observe en 2009 comme 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 le Centre de la France. La Corse pour 2009 n'a pas rapporté de cas. En 2008, les régions les plus touchées étaient le Sud et l'Est.

Ces disparités régionales pourraient correspondre à de réelles différences notamment en termes d'habitudes alimentaires, de populations à risques 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 2005

Région	Année				
	2005	2006	2007	2008	2009
Alsace	7	8	12	12	7
Aquitaine	13	16	32	20	19
Auvergne	1	6	8	5	8
Basse-Normandie	6	2	10	5	7
Bourgogne	5	9	7	7	10
Bretagne	13	16	15	14	15
Centre	7	11	8	7	16
Champagne-Ardenne	3	7	3	7	7
Corse	2	4	3	0	0
Franche-Comté	4	2	1	1	6
Haute-Normandie	5	7	4	6	10
Ile-de-France	36	42	63	44	58
Languedoc-Roussillon	7	10	7	14	17
Limousin	1	2	6	2	4
Lorraine	11	7	2	8	10
Midi-Pyrénées	18	25	17	17	12
Nord-Pas-de-Calais	15	11	21	12	15
Pays de la Loire	9	11	4	11	9
Picardie	3	12	7	6	10
Poitou-Charentes	2	6	8	5	9
Provence-Alpes-Côte-d'Azur	16	31	19	18	25
Rhône-Alpes	18	26	42	47	43
<b>Total</b>	<b>202</b>	<b>271</b>	<b>299</b>	<b>268</b>	<b>317</b>

### 3.1.3.2 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

Quarante-cinq formes materno-néonatales ont été enregistrées, représentant 14 % du nombre total de cas sporadiques pour 2009 (Figure 10). Ce nombre de cas en 2009 est supérieur de 67% à celui de 2008 et proche de celui de 2007. La distribution mensuelle fait apparaître des variations qui suivent le plus souvent la courbe générale des cas sporadiques (Figure 11). La distribution par région est indiquée dans le tableau 5.

## Formes non materno-néonatales

Deux cent soixante douze formes non materno-néonatales ont été enregistrées (contre 240 formes en 2008 et 257 formes en 2007), soit 86 % du total des cas sporadiques pour 2009, qui se répartissent comme suit :

- 168 (61 %) septicémies,
- 85 (31 %) infections du système nerveux central,
- 19 (8 %) 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 12 et 13). **Ce sont ces formes cliniques, ainsi que les septicémies (voir plus bas) qui ont le plus augmenté en 2009 dans ces formes non materno-néonatales.**

- **Le pourcentage des formes septicémiques, après une augmentation depuis 2005 et une baisse en 2008, sont en augmentation par rapport à 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.

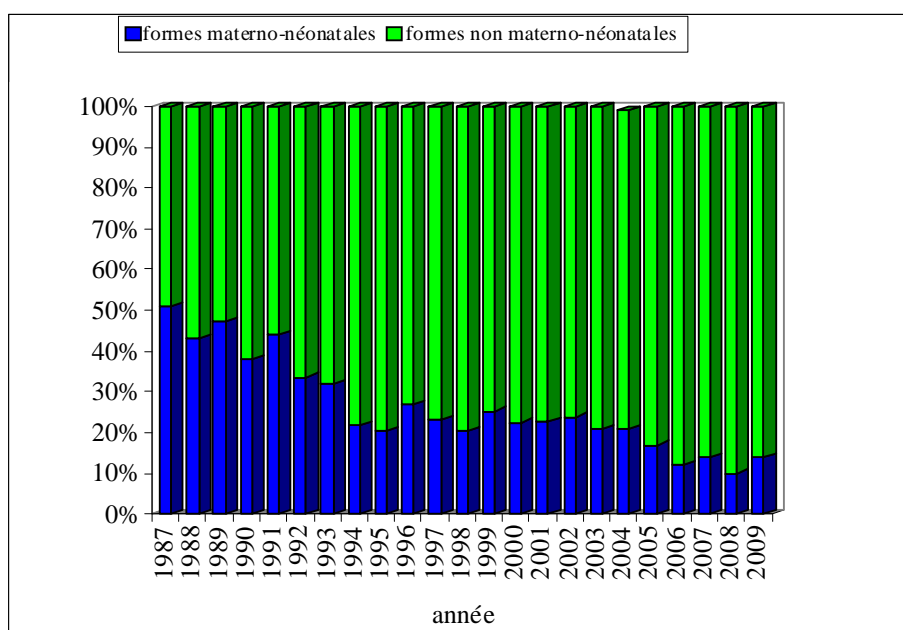
- Les formes cliniques « autres » correspondent à des atteintes focales. Elles sont similaires à celles de 2008 représentant 8% (contre 7% en 2008 et 4% en 2007) de tous les cas de listériose non materno-fœtale. Ces infections ou colonisations consistaient en : infection du liquide d'ascite (3 cas), infection sur prothèse de hanche (5 cas), infection articulaire (2 cas), cholécystite/abcès hépatique (2 cas), Erysipèle (1 cas), pleurésie (1 cas), décompensation cardiaque (1 cas), infection urinaire (1 cas), pneumopathie (1 cas), abcès de prothèse aortique (1 cas) et une contamination de liquide de dialyse péritonéale (1 cas).

↳ En 2009, le CNRL a poursuivi son investigation sur les cas d'infections sur prothèses de hanche depuis 2000 et les abcès hépatiques/cholécystites pour en effectuer une synthèse microbiologique et clinique.

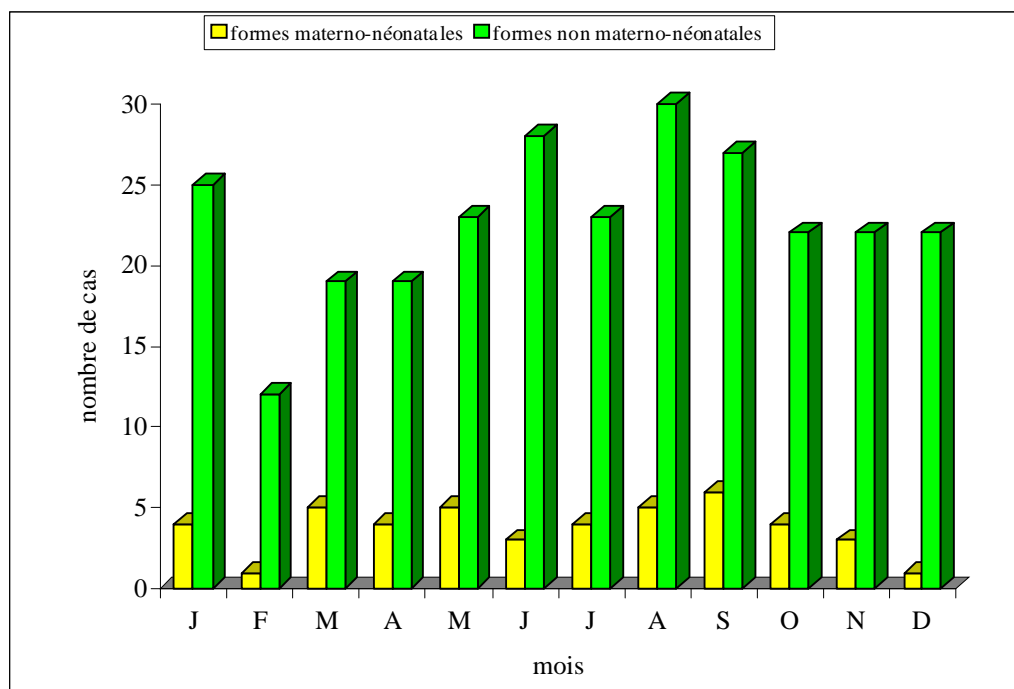
↳ Dans un cas de péritonite à *L. monocytogenes* où la souche a été isolée d'un liquide péritonéal chez une patiente porteuse d'un cathéter péritonéal et ayant une diarrhée, une suspicion de contamination par les mains de la patiente a été évoquée mais non confirmée.

↳ En 2009, le CNRL a attiré l'attention de ses correspondants sur une infection urinaire à *L. monocytogenes*.

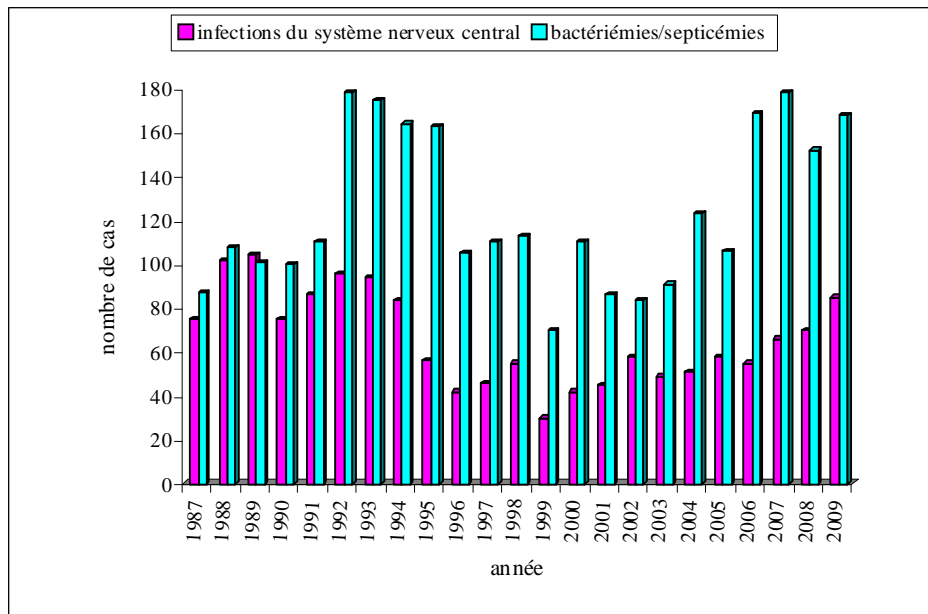
**Figure 10 :** Distribution des cas sporadiques de listériose en France métropolitaine depuis 1987 selon la forme clinique.



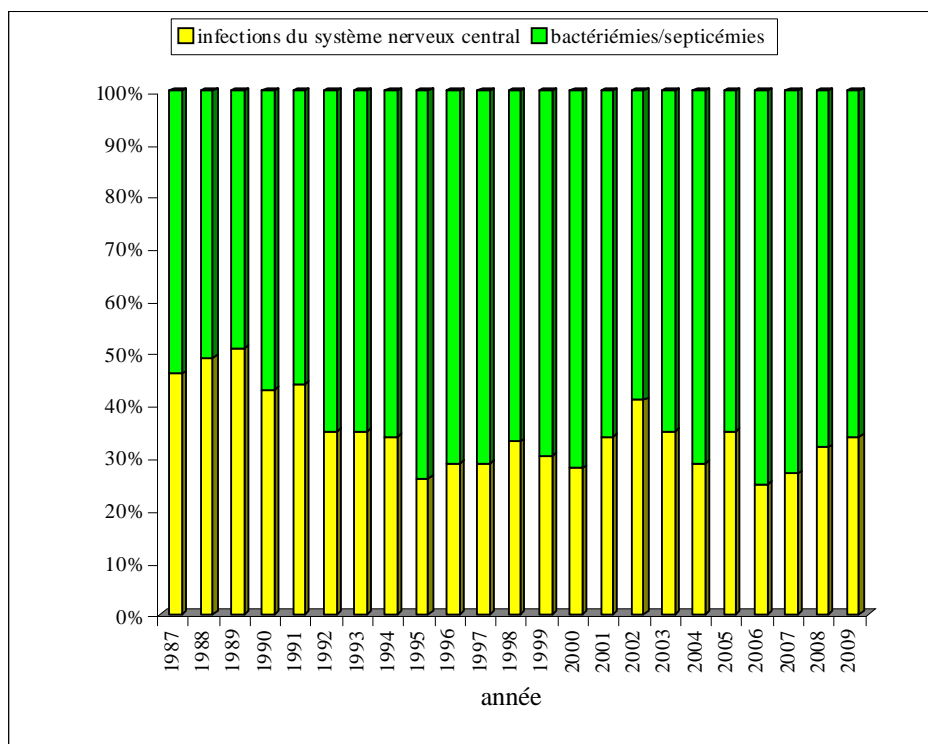
**Figure 11 :** Distribution mensuelle des cas sporadiques de listériose en France métropolitaine en 2009 selon la forme clinique.



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



**Figure 13 :** 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 10, 11 et 14.

Deux régions, l'Ile-de-France et Rhône-Alpes, ont un nombre élevé de formes non-maternonatales en 2009 par rapport à 2008. Ces deux régions majoritaires Ile de France et Rhône-Alpes l'étaient également en 2007 mais pas en 2008.

D'un point de vue temporel, on peut observer la plus forte proportion d'autres formes durant le quatrième trimestre de 2009 par rapport à 2008. On peut observer que le nombre de cas de formes septicémiques est le plus élevé en Aout 2009 et le nombre de cas d'infections du système nerveux central dans le dernier trimestre de 2009 par rapport à 2008.

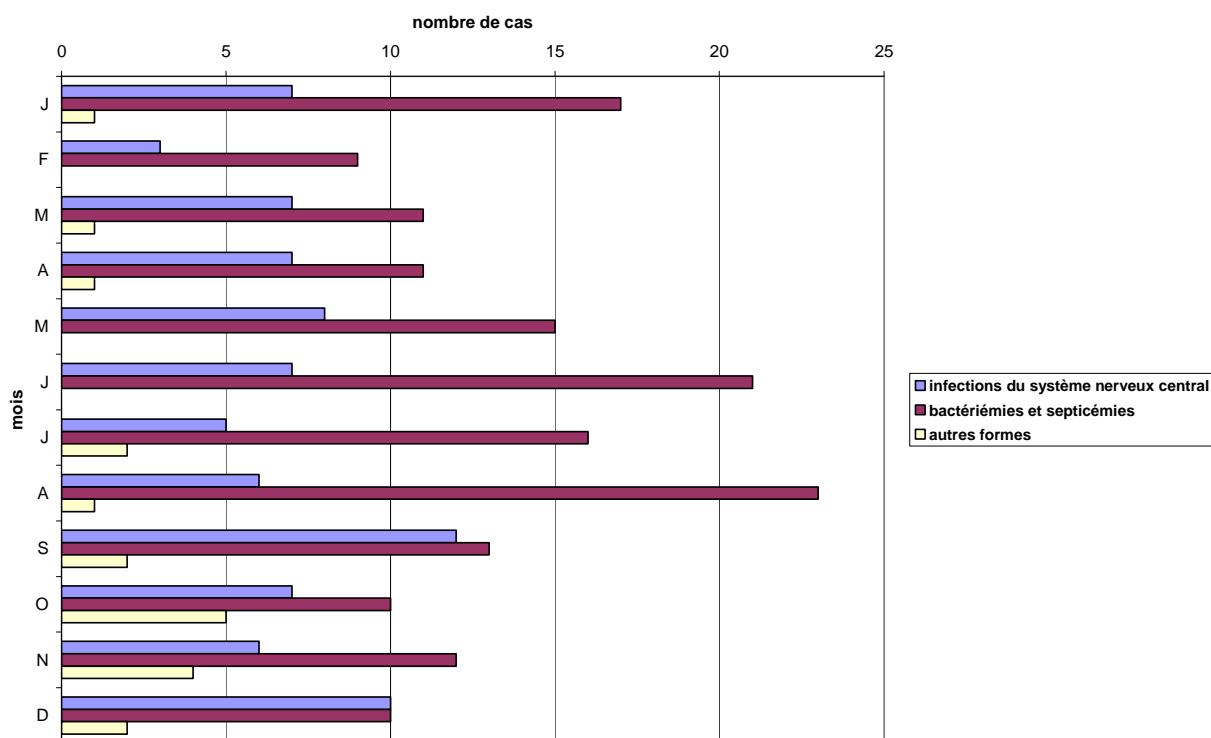
**Tableau 5 :** Distribution régionale des cas sporadiques de listériose en France Métropolitaine en 2009 selon la forme clinique.

Région	Total	Formes materno-néonatales	Formes non materno-néonatales
Alsace	7	0	7
Aquitaine	19	1	18
Auvergne	8	0	8
Basse-Normandie	7	2	5
Bourgogne	10	0	10
Bretagne	15	1	14
Centre	16	2	14
Champagne-Ardenne	7	0	7
Corse	0	0	0
Franche-Comté	6	0	6
Haute-Normandie	10	2	8
Ile-de-France	58	19	39
Languedoc-Roussillon	17	2	15
Limousin	4	0	4
Lorraine	10	1	9
Midi-Pyrénées	12	2	10
Nord-Pas-de-Calais	15	1	14
Pays de la Loire	9	1	8
Picardie	10	1	9
Poitou-Charentes	9	0	9
Provence-Alpes-Côte-D'azur	25	5	20
Rhône-Alpes	43	5	38
<b>Total</b>	<b>317</b>	<b>45</b>	<b>272</b>

**Tableau 6 :** Distribution mensuelle des formes sporadiques de listériose non materno-néonatale en France métropolitaine en 2009.

Mois	Infections du système nerveux central	Septicémies	Autres formes	Total
<b>J</b>	7	17	1	25
<b>F</b>	3	9	0	12
<b>M</b>	7	11	1	19
<b>A</b>	7	11	1	19
<b>M</b>	8	15	0	23
<b>J</b>	7	21	0	28
<b>J</b>	5	16	2	23
<b>A</b>	6	23	1	30
<b>S</b>	12	13	2	27
<b>O</b>	7	10	5	22
<b>N</b>	6	12	4	22
<b>D</b>	10	10	2	22
<b>Total</b>	<b>85</b>	<b>168</b>	<b>19</b>	<b>272</b>

**Figure 14 :** Distribution mensuelle des formes sporadiques de listériose non materno-néonatale en France métropolitaine en 2009.





## *Terrain*

L'information sur l'existence ou non d'une affection sous-jacente ou concomitante était disponible dans 272 cas (86% contre 90 % en 2008 et 86% en 2007). Pour 151 patients (55% des cas renseignés), une ou plusieurs affections sous-jacentes, décrites pour favoriser la listériose, étaient rapportées : cancer, cirrhose, éthyliste, diabète, dialyse, infection par le VIH, transplantation d'organe et traitement immunosuppresseur. Par ailleurs, 121 patients (45 %) 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 cliniques.

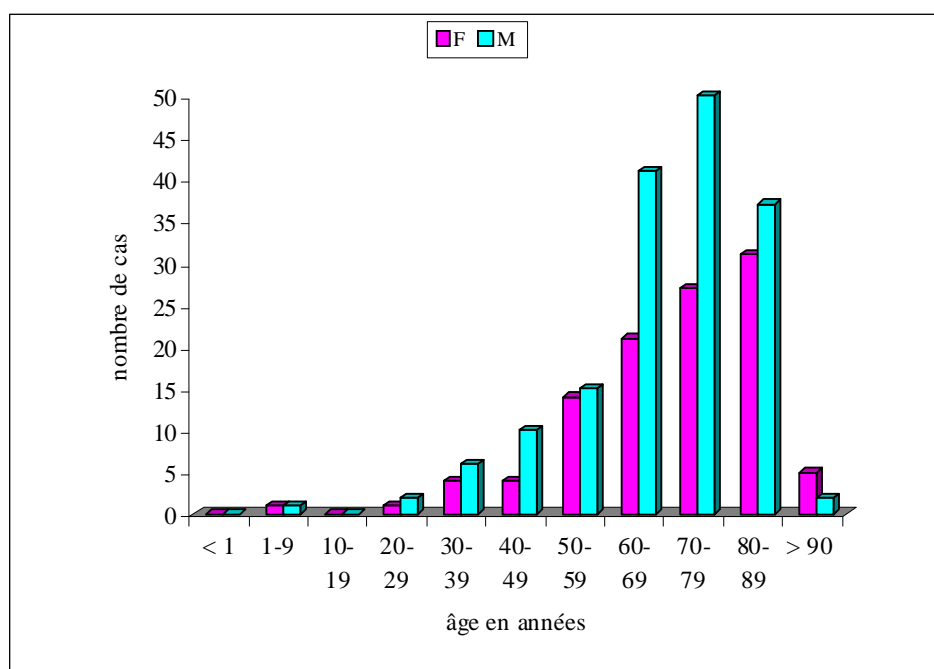
## *Age et sexe des patients avec listériose non materno-néonatale sporadique*

L'âge moyen était de 69 ans [ $<1$  à 101 ans] ce qui est comparable à 2008 et 2007. Dans 214 cas (79 %), l'infection est survenue après 60 ans, dans 56 cas (21 %) entre 21 et 60 ans et dans 2 cas ( $<1$  %) avant 21 ans, tous sexes et formes cliniques confondus (figure 15). La population à risque pour les formes non materno-néonatales reste constituée par les personnes de plus de 60 ans, et notamment de plus de 70 ans. Le sexe ratio M/F était de 1,5 en 2009 contre 1,3 en 2008 et 1,6 en 2007. Cette relative prédominance de la listériose chez l'homme s'observe quelle que soit la forme clinique et est inexplicable (Tableau 7 et Figure 15). 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 (5 cas contre 2), probablement attribuable à la prédominance de femmes dans cette classe d'âge, liée à une espérance de vie accrue.

**Tableau 7 :** Distribution par classe d'âge, par sexe et par forme clinique des formes non materno-néonatales sporadiques en France métropolitaine en 2009.

Sexe	Classe d'âge	Total	Infections du		
			système nerveux central	Septicémies	Autres formes
F	> 28 jours-20 ans	1	1	0	0
	21-60 ans	23	6	17	0
	> 60 ans	84	27	52	5
M	> 28 jours-20 ans	1	1	0	0
	21-60 ans	33	17	14	2
	> 60 ans	130	33	85	12
Total	> 28 jours-20 ans	2	2	0	0
	21-60 ans	56	23	31	2
	> 60 ans	214	60	137	17

**Figure 15 :** Distribution par classe d'âge et par sexe des formes sporadiques de listériose non materno-néonatale en France métropolitaine en 2009.



### 3.1.3.3 DISTRIBUTION DES SOUCHES SELON LE GROUPE PCR

#### *Analyse générale*

Les résultats obtenus pour les 317 souches d'origine humaine de France métropolitaine sont les suivants :

- groupe PCR IIa (souches de sérovar 1/2a ou 3a) : 88 souches (28 %),
- groupe PCR IIb (souches de sérovar 1/2b, 3b ou 7) : 46 souches (14 %),
- groupe PCR IIc (souches de sérovar 1/2c ou 3c) : 24 souches (8 %),
- groupe PCR IVb (souches de sérovar 4b, 4d ou 4e) : 158 souches (50 %),
- groupe PCR L (souches de sérovar 4ab, 4c, 7) : 1 souche (<1 %)
- groupe PCR nouveau (sérovar 4b) 0 souche (0 %)

Par rapport à l'année 2008, le CNRL n'a pas identifié de nouveau profil de groupe PCR pour les souches d'origine humaine. En revanche, une souche humaine provenant d'une infection du système nerveux central de groupe PCR L a été sérotypée comme sérovar 4c, ce qui est un sérovar rare pour une souche humaine.

Si les distributions parmi les 4 groupes PCR restent à peu près inchangées, il est intéressant de souligner un nombre plus faible de souches du groupe PCR IVb par rapport à 2008 mais similaire à 2007 (Figure 16) et l'augmentation continue des souches de groupe PCR IIc rarement associées à des cas humains bien que non constatée en 2008. Cependant, comme le montre la figure 16, 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 diminution de la fréquence du sérovar 4b et une augmentation des sérovars 1/2a et 1/2b au cours des infections humaines, accompagnant l'augmentation des formes septicémiques et la diminution des formes neuroméningées. En France, cette tendance n'est pas observée.

↳ Pour 2009, 8 signalements ont été associés à des souches du groupe PCR IVb, 2 signalements au groupe PCR IIa et un signalement au groupe IIc ce qui est différent de ce qui a été constaté en 2008 où le groupe IVb était majoritaire (cf. chapitre 3.3.3.).

#### *Distribution temporelle des groupes PCR*

La distribution mensuelle des 5 principaux groupes PCR ne permet pas de mettre en évidence de saisonnalité particulière pour un groupe PCR donné (Figure 17).

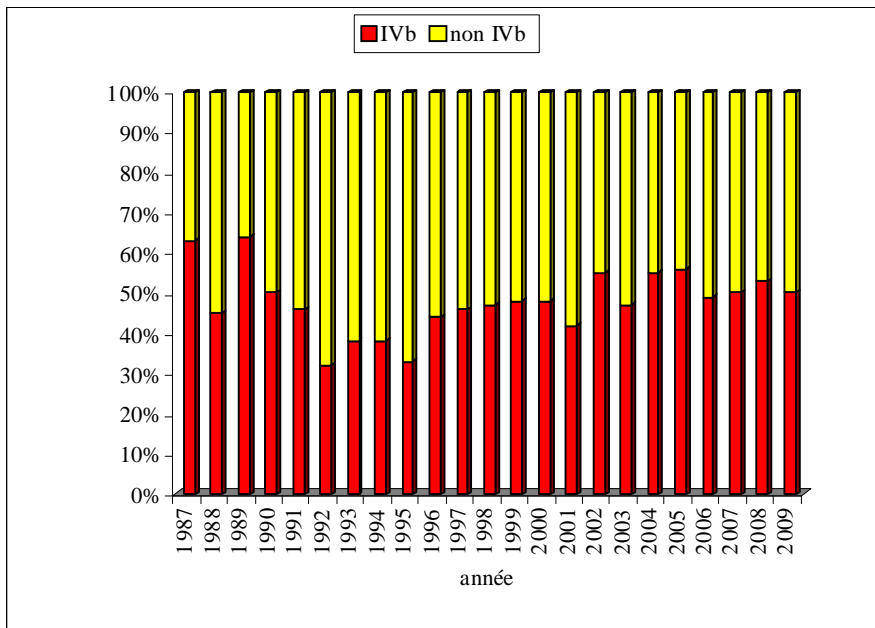
### *Distribution régionale des groupes PCR*

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.

**Tableau 8** : Distribution régionale des cas sporadiques de listériose en France métropolitaine en 2009 selon les groupes PCR

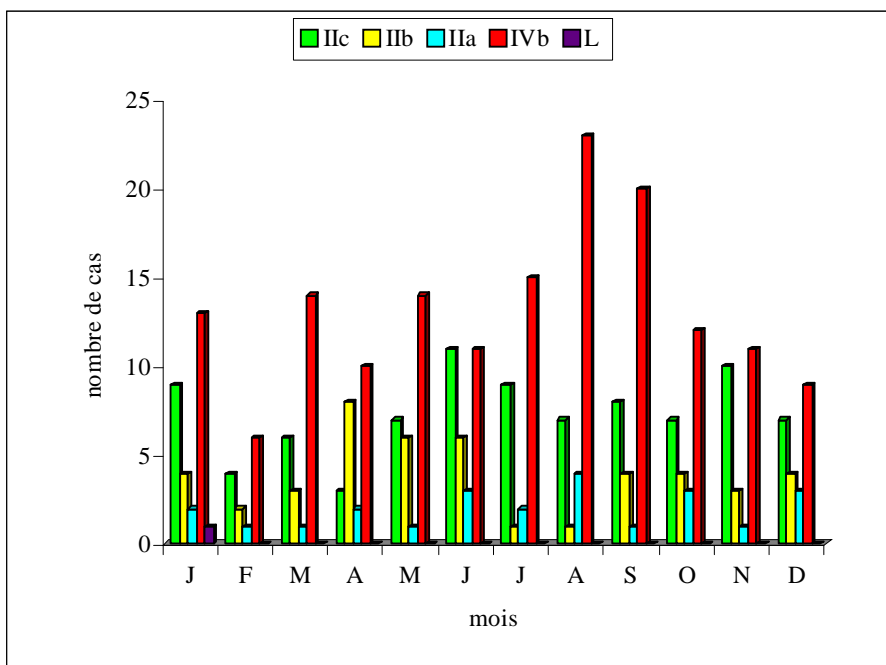
<b>Région</b>	<b>Total</b>	<b>IIa</b>	<b>IIb</b>	<b>IIc</b>	<b>IVb</b>	<b>L</b>
Alsace	7	2	0	1	4	0
Aquitaine	19	2	1	2	14	0
Auvergne	8	3	0	1	4	0
Basse-Normandie	7	0	4	1	2	0
Bourgogne	10	7	1	1	1	0
Bretagne	15	1	1	3	10	0
Centre	16	4	4	2	6	0
Champagne-Ardenne	7	3	1	2	1	0
Corse	0	0	0	0	0	0
Franche-Comté	6	4	1	0	1	0
Haute-Normandie	10	4	2	0	4	0
Ile-de-France	58	11	9	2	35	1
Languedoc-Roussillon	17	9	4	0	4	0
Limousin	4	0	0	0	4	0
Lorraine	10	4	2	1	3	0
Midi-Pyrénées	12	3	0	0	9	0
Nord-Pas-de-Calais	15	4	1	0	10	0
Pays de la Loire	9	3	1	1	4	0
Picardie	10	1	1	5	3	0
Poitou-Charentes	9	3	2	0	4	0
Provence-Alpes-Côte-D'azur	25	11	4	1	9	0
Rhône-Alpes	43	9	7	1	26	0
<b>Total</b>	<b>317</b>	<b>88</b>	<b>46</b>	<b>24</b>	<b>158</b>	<b>1</b>

**Figure 16:** 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 17:** Distribution mensuelle des souches de *L. monocytogenes* des 4 principaux groupes PCR responsables de cas sporadiques de listériose en France métropolitaine en 2009.



### *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 (Tableau 10). La proportion de souches par groupe PCR est voisine de celle de 2008 pour les formes non-materno-néonatales, sauf pour le groupe PCR IIc. Pour les septicémies, les deux groupes majeurs PCR sont le IIa (33%) et le IVb (42%). Pour les formes d'infections du système nerveux central, le groupe majeur PCR est le IVb (54%). Pour les formes materno-néonatales, les groupes PCR non IVb (= IIa) sont en augmentation, soit 31% en 2009 contre 11% en 2008 mais 32 % en 2007.

En 2009, le groupe PCR IIc, plus rare, a été principalement associé à des septicémies comme en 2008. En 2009, il a été aussi associé à un cas d'infection du système nerveux central comme en 2008 et à deux cas de formes materno-néonatales comme en 2007. En revanche, le groupe PCR IIc n'a pas été associé à une autre forme d'infection contrairement à 2007-2008.

#### Formes materno-néonatales

Les 45 souches à l'origine des formes materno-néonatales se répartissent comme suit :

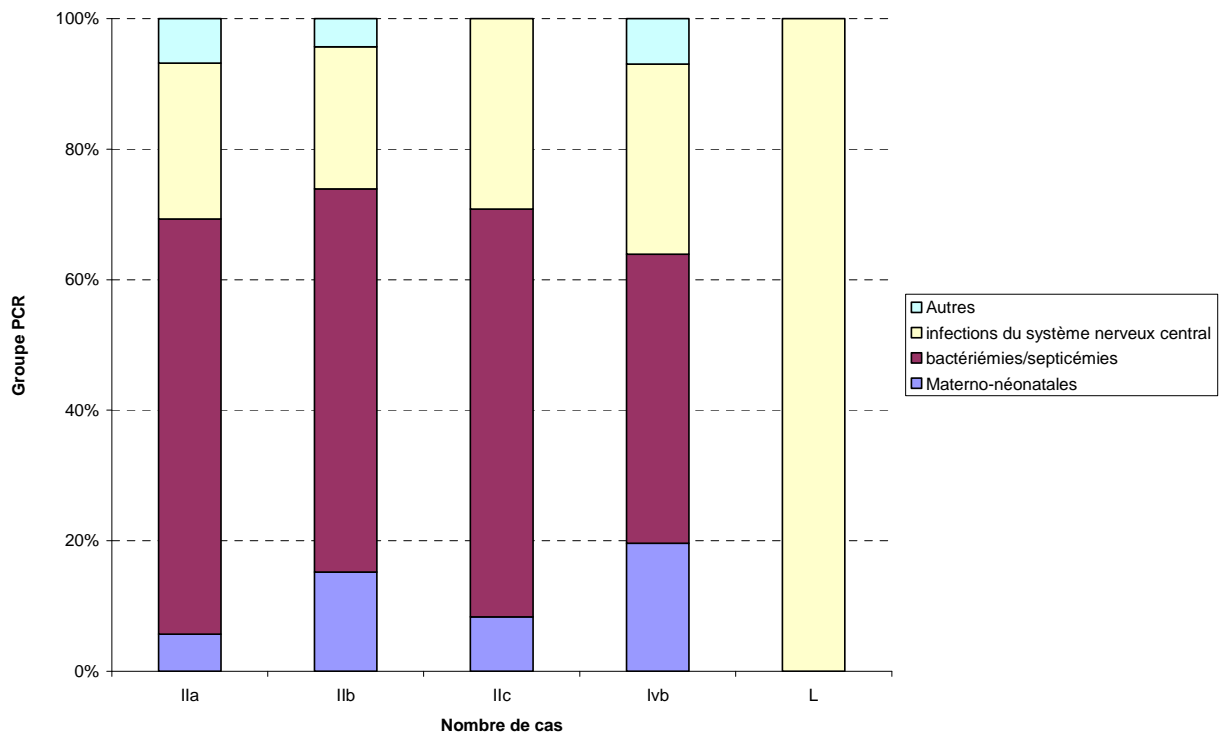
- groupe PCR IIa (souches de sérovar 1/2a ou 3a) : 5 souches (11 %),
- groupe PCR IIb (souches de sérovar 1/2b ou 3b ou 7) : 7 souches (16 %),
- groupe PCR IIc (souches de sérovar 1/2c ou 3c) : 2 souches (4 %),
- groupe PCR IVb (souches de sérovar 4b ou 4d ou 4e) : 31 souches (69 %),
- groupe PCR L (souches de sérovar 4ab, 4c, 7) : 0 souche (0 %),
- groupe PCR nouveau (sérovar 4b) : 0 souche (0 %).

#### Formes non materno-néonatales

Les 272 souches à l'origine des formes non materno-néonatales se répartissent comme suit :

- groupe PCR IIa (souches de sérovar 1/2a ou 3a) : 83 souches (31 %),
- groupe PCR IIb (souches de sérovar 1/2b ou 3b ou 7) : 39 souches (14 %),
- groupe PCR IIc (souche de sérovar 1/2c ou 3c) : 22 souches (8 %),
- groupe PCR IVb (souches de sérovar 4b ou 4d ou 4e) : 127 souches (47 %),
- groupe PCR L (souches de sérovar 4ab, 4c, 7) : 1 souche (<1 %),
- groupe PCR nouveau (Sérovar 4b) : 0 souche (0 %).

**Figure 18 :** Distribution des groupes PCR des souches de *L. monocytogenes* en fonction des formes cliniques en France métropolitaine en 2009.



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 18) et ces souches en 2009 sont plus fréquemment associées à des formes bactériémiques et des infections du système nerveux central. Les souches des groupes PCR Ila, I Ib, I Ic sont en proportion plus associées aux formes bactériémiques que les autres formes, comme en 2007 et 2008. Une hypothèse pouvant expliquer cette répartition peut être la plus faible proportion d'expression d'InIA tronquées dans le groupe PCR IVb, sa grande fréquence dans le groupe I Ic, 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 2009.

Sexe	Classe d'âge	Total	Groupe PCR					
			IIa	IIb	IIc	IVb	L	Nouveau
F	> 28 jours-20 ans	1	1	0	0	0	0	0
	21-60 ans	23	9	4	2	8	0	0
	> 60 ans	84	26	14	7	37	0	0
M	> 28 jours-20 ans	1	0	0	0	1	0	0
	21-60 ans	33	11	1	4	16	1	0
	> 60 ans	130	36	20	9	65	0	0
Total	> 28 jours-20 ans	2	1	0	0	1	0	0
	21-60 ans	56	20	5	6	24	1	0
	> 60 ans	214	62	34	16	102	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 2009.

Forme clinique	Groupe PCR						
	Total	IIa	IIb	IIc	IVb	L	Nouveau
Materno-néonatales	45	5 (6%)	7(15%)	2(8%)	31(20%)	0(0%)	0(0%)
Septicémies	168	56(63%)	27(59%)	15(62%)	70(44%)	0(0%)	0(0%)
Infections du système nerveux central	85	21(24%)	10(22%)	7(30%)	46(29%)	1(100%)	0(0%)
Autres	19	6(7%)	2(4%)	0(0%)	11(7%)	0(0%)	0(0%)
<b>Total</b>	<b>317</b>	<b>88</b>	<b>46</b>	<b>24</b>	<b>158</b>	<b>1</b>	<b>0</b>

### 3.1.4 CAS DE LISTERIOSE DANS LES DOM-TOM

En 2009, 5 cas sporadiques de listériose (contre 5 en 2008 et 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
<b>Martinique</b>					
Bactériémie	1	1	0	0	0
Materno-néonatales	1	0	0	0	1
<b>Guadeloupe</b>					
Materno-néonatales	1	0	0	0	1
-----					
<b>Ile de la réunion</b>					
Bactériémie	1	0	0	0	1
Materno-néonatales	1	0	0	0	1
<b>TOTAL</b>	<b>5</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>4</b>

La répartition relative par séro groupe PCR représente les principaux groupes PCR retrouvés pour ces cas cliniques avec une prépondérance du groupe PCR IVb par rapport à 2008 mais comme en 2007.

La répartition des formes cliniques est la suivante :

- formes materno-néonatales : 60 % (contre 0% en 2008 et 29 % en 2007)
- infections du système nerveux central : 0% (contre 60% en 2008 et 29 % en 2007)
- septicémies : 40% (contre 40% en 2008 et 42 % en 2007)

Cette répartition diffère de celle de 2008 et de 2007 par un abaissement du nombre de formes d'infections du système nerveux central et une augmentation des formes materno-néonatales 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 par la méthode de diffusion par disque a été effectuée en parallèle de leur caractérisation de façon prospective, tout au long de l'année 2009 (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, au triméthoprim 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.

Toutes les souches étaient sensibles à l'érythromycine, linézolid, acide fucidique, vancomycine, tétracycline, chloramphénicol. Trois souches présentaient une résistance à la ciprofloxacine (2 cas de bactériémie et un cas de forme neuroméningée). Une souche présentait une résistance à la rifampicine (1 cas d'infection sur prothèse de hanche).

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 sauf trois souches qui présentaient une résistance à la streptomycine (2 cas de bactériémie et un cas d'infection du système nerveux central). Le mécanisme de résistance de l'ensemble de ces souches est en cours d'étude.

*L. monocytogenes* est une bactérie pour laquelle il est certes décrit des résistances acquises à certains antibiotiques d'intérêt clinique, mais ceci reste très 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. L'absence de souches résistantes au triméthoprime en 2009 est rassurante. Il convient cependant de surveiller attentivement l'émergence de 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 2009, cette troisième enzyme a été intégrée dans la routine en cas de profils combinés *AscI/ApaI* difficilement dissociables ou à la demande de l'InVS pour approfondir l'investigation microbiologique de signalements, 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.

### *Analyse des profils de macrorestriction d'ADN présents dans les signalements*

Si l'on examine les profils des souches ayant occasionné des signalements depuis 2006 (année de changement de la définition du signalement), on s'aperçoit que certains profils sont majoritairement rencontrés en France (Tableau 12) et, compte tenu des données du CCOMS, en dehors de France.

Les profils majoritairement retrouvés en France depuis 2006 sont les clones issus de l'épidémie de 1992 puis de l'épidémie de 2002. Il semble donc que ce clone soit devenu résident en France. Par l'intermédiaire de cette analyse, le CNRL, lors de sa surveillance hebdomadaire de la listériose, évalue les tendances des souches alimentaires et humaines ayant ces profils particuliers prépondérants dans les signalements.

**Tableau 12** : Distribution par profils *AscI* et *ApaI* et groupe PCR des signalements de 2006 à 2009.

Profils <i>AscI/ApaI</i>	Groupe PCR	Nombre de signalements par année				Nombre total de signalements
		2006**	2007	2008	2009	
010901/020701	IIa	2	2	0	1	5
271106/271106	IIa	1	0	0	0	1
241006/241006	IIa	0	0	0	1	1
090507/180407	IIb	0	1	0	0	1
301006/301006	IIc	0	0	0	1	1
200792/200792*	IVb	1	4	3	1	9
210792/210792	IVb	1	2	2	1	6
270801/050506	IVb	2	3	0	0	5
151005/151005	IVb	1	1	1	2	5
011001/160602	IVb	1	1	1	3	6
220803/200792	IVb	0	1	1	0	2
210792/201194	IVb	1	0	0	0	1
160902/160902	IVb	1	0	0	0	1
200792/170407	IVb	0	1	0	0	1
151005/111206	IVb	0	0	1	1	2
Total		11	16	9	11	47

\* le numéro de nomenclature correspond à la date de la première apparition de ce profil lors de la surveillance hebdomadaire (ex : 200792 = profil du 20 Juillet 1992) ; \*\*année du changement de la définition du signalement

### *Analyse des profils de macrorestriction d'ADN des souches humaines*

D'après le tableau 13, on peut observer que les fréquences majeures des profils de macrorestriction d'ADN des souches humaines en 2009 reflètent les profils répertoriés dans les signalements en 2008 à l'exception des profils de macrorestriction :

- M-IIa-241006-241006 constaté dans les signalements de 2009 mais non en 2008 ;
- M-IIc-301006-301006 non constaté dans des signalements depuis 2006 mais présent en 2009 ;
- M-IVb-220803-200792 constaté dans les signalements de 2008 mais non en 2009.

Le profil M-IIc-301006-301006 assez fréquent pour les souches alimentaires avait été mis « sous surveillance » par le CNRL en 2008. En 2009, ceux sont les profils M-IIb-231006-310801, M-IVb-270801-050506 et M-IIb-010107-010107 qui sont mis « sous surveillance » par le CNRL par leur fréquence (>7 profils en 2009) dans les souches alimentaires.

Les profils majoritairement représentés (>8 en fréquence) et constants depuis 2006 sont en augmentation en 2009.

Dans le cas des souches humaines, le nombre de profils de macrorestriction d'ADN est plus restreint que dans le cas des souches non-humaines, surtout pour le groupe PCR IIa.

Concernant les profils uniques de macrorestriction d'ADN des souches humaines, ils représentent 31% en 2009 contre 34% en 2008, 25% en 2007 et 26% en 2006. Il semble donc qu'il y ait une augmentation jusqu'en 2008 de ces profils uniques mais pas en 2009.

**Tableau 13.** Fréquence des profils de macrorestriction d'ADN des souches humaines en 2008 et 2009.

Fréquence des profils en 2008	Nombre en 2008	Fréquence des profils en 2009	Nombre en 2009	Profils de macrorestriction (Espèce-Groupe PCR-Pulsovar AscI-Pulsovar ApaI)	Présence (X) dans un signalement en 2008	Présence (X) dans un signalement en 2009
1*	94*	1	98	Non détaillés	-	-
2	12	2	8	Non détaillés	-	-
3	7	3	6	Non détaillés	-	-
4	1	3	1	M-IIa-080507-020507	-	-
3	1	4	1	M-IIa-271106-271106	-	-
0	0	4	1	M-IIb-310801-121006	-	-
0	0	4	1	M-IIa-070708-030809	-	-
0	0	4	1	M-IIa-190704-270904	-	-
3	1	4	1	M-IIa-010901bis-020701bis	-	-
4	1	4	1	M-IVb-270801-050506bis	-	-
6	1	4	1	M-IIb-310801-310801	-	-
1	1	5	1	M-IIa-241006-241006	-	L09/03
8	1	6	1	M-IIa-010901-020701	L07/12	L09/11
3	1	7	1	M-IIb-231006-310801	-	-
7	1	8	1	M-IVb-270801-050506	-	-
2	1	9	1	M-IIb-010107-010107	-	-
5	1	9	1	M-IVb-220803-200792	L08/04	-
10	1	15	1	M-IVb-151005-151005	L08/08	L09/04, L09/09
12	1	16	1	M-IVb-011001-160602	L08/02	L09/02, L09/05, L09/10
10	1	17	1	M-IVb-151005-111206	L08/08	L09/07
9	1	19	1	M-IIc-301006-301006	-	L09/08
24	1	21	1	M-IVb-210792-210792	L08/03, L08/06, L08/07	L09/06
18	1	22	1	M-IVb-200792-200792	L08/01, L08/05, L08/09	L09/01

\*explication : 94 profils ayant été présents qu'une seule fois associés à une souche humaine en 2008.

### 3.2 CARACTERISATION DES SOUCHES D'ORIGINE NON HUMAINE

L'analyse 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.

Les souches isolées lors de contrôles sanitaires (Alertes de la Direction Générale de l'Alimentation (DGAI) 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 DGAI.

En 2008, une réunion entre la DGAI, l'InVS, le CNRL et le LNRI a permis de préciser la destination des souches de *L. monocytogenes* françaises d'origine alimentaire. En 2009, le flux des souches a été conforme à ce qui a été décidé lors de cette réunion.

### 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 :

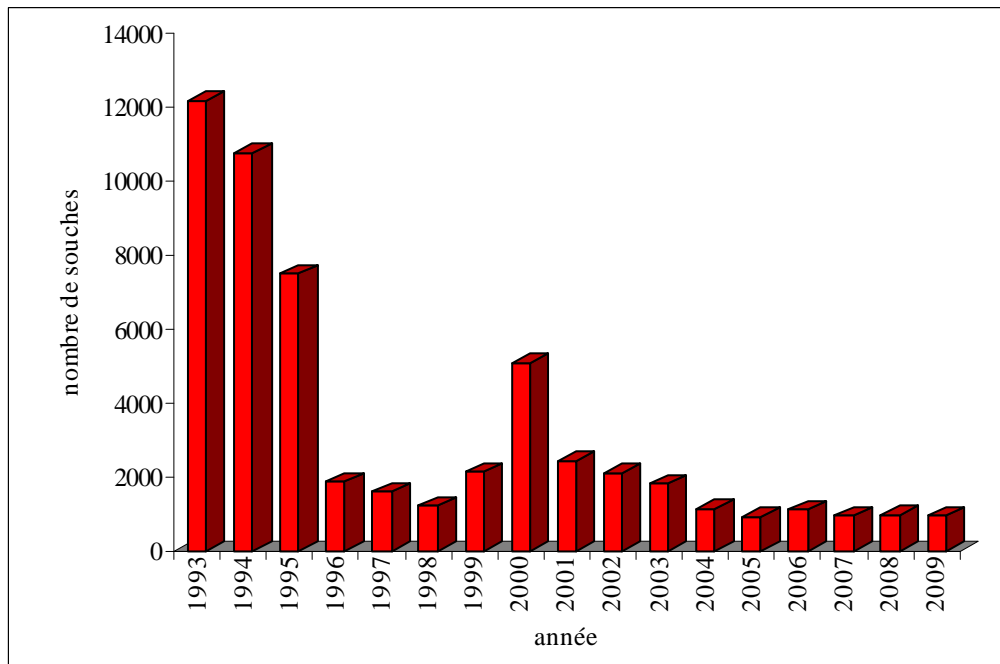
- constituer une banque de données qui permet éventuellement d'orienter les investigations en début d'épidémie,
- participer à l'identification du véhicule alimentaire lors d'épidémies,
- comparer les souches cliniques aux souches alimentaires et tenter d'en identifier les caractéristiques respectives.

**En 2009, 948 souches d'origine non humaine** ont été adressées au CNRL par des laboratoires français, soit une diminution de 4% par rapport à 2008 (Figure 19). Ce nombre reste stable depuis 2007 et est cependant relativement faible en raison de l'existence de destinataires multiples pour ce type de souches (LNRI ou autres laboratoires spécialisés type IFIP ou Maisons-Alfort).

Le CNRL a reçu des souches alimentaires dans le cadre d'une contre-expertise diligentée par un assureur 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 depuis 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 19:** 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) : 277 souches (29 %),
- Laboratoires privés d'hygiène alimentaire : 584 souches (62 %),
- Laboratoires Interrégionaux de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes : 65 souches (7 %),
- Laboratoires hospitaliers d'hygiène : 10 souches (1 %),
- Laboratoire AFSSA – LNRI/LCR : 12 souches (1%).

Le taux de souches envoyées par les laboratoires vétérinaires départementaux (29% en 2009 contre 45% en 2008) baisse face au taux de souches envoyées par les laboratoires privés d'hygiène alimentaire.

L'origine des souches était la suivante :

- souches isolées d'aliments : 810 souches (85 %),
- souches isolées de l'environnement : 114 souches (12 %),
- souches sans information : 22 souches (2 %),
- souches isolées chez l'animal : 2 souches (<1 %).

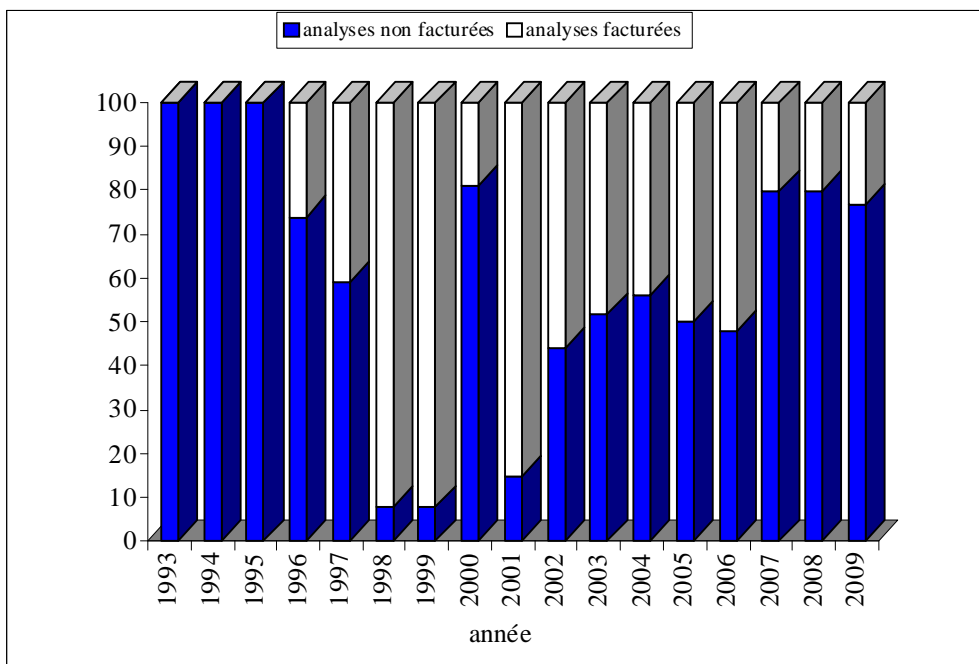
Les souches sans information sont des souches réceptionnées de laboratoires d'analyses privés pour caractérisation des souches. Cette expertise est alors facturée au laboratoire demandeur.

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.

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 2009, 23 % des essais ont fait l'objet d'une facturation (contre 20% en 2008) (Figure 20). Étant donnée la fragilité du système d'envoi des souches alimentaires ou environnementales vers le CNRL, le CNRL a décidé de ne plus facturer toutes les caractérisations de souches qui rentraient directement dans le système de surveillance français de la listériose. Les souches traitées de façon confidentielle à la demande du client, les envois en nombre conséquent ou les demandes à caractère exceptionnel sont facturés au cas par cas.

**Figure 20** : 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 810 souches isolées d'aliments, selon la catégorie de laboratoires, était la suivante :

- Laboratoires Vétérinaires Départementaux (LVD) : 238 souches (29 %),
- Laboratoires privés d'hygiène alimentaire : 491 souches (61 %),
- Laboratoires Interrégionaux de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes : 65 souches (8 %),
- Laboratoires hospitaliers d'hygiène : 10 souches (1 %),
- Laboratoire AFSSA LNRI/LCR : 6 souches (1 %).

↳ **En 2009, le nombre de souches a diminué de 9% par rapport au nombre de 2008 (860 souches).** 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 (IFIP, Maisons-Alfort) qui peut conduire à un effet de dilution, voire à des erreurs de destinataires selon le type de souches concernées. En 2009, le CNRL s'est rapproché de l'IFIP et du LNRI afin d'accroître les échanges d'informations nécessaires à la surveillance nationale de la listériose.
- 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.

Le CNRL avait effectué en 2008 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. Il présente un résumé de la situation sur l'augmentation des cas de listérioses en France et comporte une synthèse sur les alertes produits. En 2009, lors d'échanges avec les correspondants du CNRL, un retour positif sur ces publications et une meilleure compréhension et intérêt du système de surveillance a été notée.

↳ Comme en 2008, le CNRL a reçu en 2009 de nombreux appels téléphoniques et courriels d'hygiénistes hospitaliers ou de directeurs 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. Il convient aux autorités sanitaires d'instruire ce type de sollicitation. En effet, le règlement EC 2073/2005 en hygiène des aliments n'est pas complètement applicable tel quel pour ces établissements comportant des populations à risques.

### 3.2.2.2 NOMBRE DE SOUCHES ET DISTRIBUTION PAR ESPECE

805 des 810 souches ont été identifiées. Les analyses sur 5 souches n'ont pas pu être effectuées par le fait qu'il ne s'agissait pas de souches de *Listeria*, même en ayant pris la sécurité de procéder à une identification génétique de cette souche. La simple coloration de Gram suffisait à écarter une large proportion de ces souches souvent des *Bacillus* qui possèdent une PIPLC et donc présentent des colonies ressemblantes à celles des *L. monocytogenes* sur la gélose chromogénique type ALOA™.

La répartition par espèce des 805 souches de *Listeria* était la suivante :

- *L. monocytogenes* : 789 souches (98 %),
- *L. ivanovii* : 6 souches (<1 %),
- *L. innocua* : 7 souches (<1 %),
- *L. welshimeri* : 2 souches (<1 %),
- *L. seeligeri* : 1 souche (<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 (<2 % 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,  $\beta$ -glucosidase et PIPLC pour identifier à l'espèce *monocytogenes* les *Listeria*. Ces géloses chromogènes sont issues des travaux de génomiques comparatives dont la PIPLC (Equipe de C. Braun-Breton, Institut Pasteur).

↳ En 2009, les travaux de révision des deux normes analytiques NF EN ISO 11290 pour la recherche et le Dénombrement des *L. monocytogenes* ont aboutit à élargir cette norme à la détection des *Listeria* spp. et *L. monocytogenes*.

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

L'origine des 789 souches de *L. monocytogenes* selon la catégorie d'aliment, était la suivante :

- viande et produits carnés : 310 souches (39%),
- lait et produits laitiers : 232 souches (30 %),
- produits de la pêche : 69 souches (9 %),
- végétaux : 19 souches (2%)
- autres aliments : 152 souches (19%),
- origine non précisée : 7 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 14. Les groupes PCR IIa (sérovars 1/2a, 3a), IIb (sérovars 1/2b, 3b, et 7), et IIc (sérovars 1/2c, 3c) représentent 80 % (comme en 2008 alors qu'il était de 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 20 % (comme en 2008 alors qu'il était de 16%) des souches isolées des aliments. Le nombre de souches du groupe PCR IVb pour ces deux dernières années est stable comme pour le groupe PCR II (IIa, IIb, IIc). Par contre, le groupe PCR IIc est passé de 6% en 2008 à 18% en 2009 et a été impliqué dans un signalement en 2009 ayant nécessité la réunion à plusieurs reprises de la cellule *Listeria*, ce qui est à surveiller pour un Groupe PCR réputé normalement peu pathogène pour l'homme. Dans ce groupe PCR IIc, il s'agit du séovar 3c et non 1/2c qui majoritairement est présent avec un profil *AscI/ApaI* de PFGE caractéristique 301006/301006.

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 listerioline S.

L'internaline A (InIA) est 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, les autres aliments (surtout plats cuisinés) ou issues de la pêche. Il est suivi ensuite du groupe PCR IIc comme pour les produits carnés ou le groupe PCR IVb pour les produits laitiers ou issues de la pêche ou le groupe IIb pour les autres aliments.

La forte proportion cette année (19% contre 5% en 2008) de souches d'autres aliments de type plats cuisinés ou aliments prêts à être consommés est à noter.

→ Cependant, au regard de nos données, les souches de produits laitiers pour le groupe PCR IVb passent de 25% en 2008 à 42% en 2009 ce qui est à surveiller et la nécessité d'une surveillance nationale des listérioses animales serait à investiguer.

**Tableau 14** : Distribution par groupe PCR et par catégorie d'aliments des 789 souches de *L. monocytogenes* reçues en 2009 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	176	65	54	14	74	7	390 (49%)
IIb	25	25	3	2	47	0	102 (13%)
IIc	84	44	3	0	12	0	143 (18%)
IVb	25	98	9	3	19	0	154 (20%)
<b>Total</b>	310 (39%)	232 (30%)	69 (9%)	19 (2%)	152 (19%)	7 (1%)	789

### 3.2.3 SOUCHES ISOLEES DE L'ENVIRONNEMENT

En 2009, 114 souches provenant de l'environnement ont été reçues au CNRL, adressées par les Laboratoires Vétérinaires Départementaux [37 (32 %)] et des laboratoires privés [77 (68 %)]. Il s'agit d'une augmentation de +9 % de souches provenant de l'environnement par rapport à l'année 2008. 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 en agro-alimentaire. Cependant, il est à noter qu'aucun prélèvement provenant du milieu hospitalier n'a été reçu en 2008 et 2009 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 112 cas (98 %) de souches de *L. monocytogenes* et dans 2 cas (2 %) de souches de *L. innocua*.

La répartition par groupe PCR des 112 souches de *L. monocytogenes* est la suivante :

- groupe PCR IIa (sérovars 1/2a et 3a) : 51 souches (46 %),
- groupe PCR IIb (sérovars 1/2b, 3b et 7) : 8 souches (7 %),
- groupe PCR IIc (sérovars 1/2c et 3c) : 8 souches (7 %),
- groupe PCR IVb (sérovars 4b, 4d et 4e) : 45 souches (40 %).

Comme pour les souches isolées d'aliments, les souches des groupes PCR IIa, IIb et IIc sont majoritaires, soit 60 % (contre 84% en 2008) des souches de *L. monocytogenes* isolées de l'environnement. Cependant, on peut noter en 2009 une remontée (de 16% en 2008 à 28% en 2009) des souches de *L. monocytogenes* du groupe PCR IVb ce qui est à surveiller car contaminant des ateliers ou des équipements.

Comme en 2008, la majorité des souches de l'environnement sont en 2009 en réalité des souches de l'environnement agro-alimentaire ou de surface de réfrigérateurs lors d'enquêtes alimentaires. Ceci empêche les chercheurs 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.

→ Une surveillance dans l'environnement naturel (eau, sol, ensilage, terre, etc.) des *Listeria monocytogenes* n'est pas effectuée alors que l'environnement naturel est la source de la contamination de la chaîne alimentaire par *L. monocytogenes* et de la diversité des souches. Les causes de l'augmentation des cas de listérioses depuis 2005 pourraient être mieux comprises par une meilleure connaissance de ces souches. Bien que la surveillance des cas de listérioses animales ou de leur contamination par *L. monocytogenes* ou *L. ivanovii* soit effectuée en France localement par les laboratoires départementaux vétérinaires, ces souches vétérinaires ne sont pas centralisées au CNRL, et un bilan national est ainsi difficile à établir. Le CNRL en 2009 a continué à conseiller les demandeurs de ce secteur pour 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 trois reprises en 2009, le diagnostic de plusieurs cas de listériose groupés temporellement et géographiquement (même hôpital, voire même service) ont fait suspecter une contamination nosocomiale.

#### **3.3.2 INVESTIGATION EN CRECHE**

Dans une crèche, des enfants de moins de 3 ans ont consommé des escalopes de poulets précuites contaminées à un taux de 1.200 UFC/g. Aucun cas humain (femmes enceintes, immunodéprimés, enfants) n'a été relié à cette alerte produit.

#### **3.3.3 SIGNALEMENTS**

En 2009, 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 2.2.2.). 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 2009 fera référence aux 2 nomenclatures (Tableaux 15 et 16).

**En 2009, le CNRL a effectué 11 signalements (contre 9 en 2008 et 16 en 2007) pour des souches majoritairement du séro groupe PCR IVb comme en 2008, pour des souches du séro groupe IIa comme en 2007 et du séro groupe IIc.** En 2009, les signalements dont les souches sont de groupe PCR IVb réputé le plus virulent et à l'origine de nombreuses épidémies souligne l'importance de surveiller ce groupe PCR. De même, la fréquence dans les souches humaines en 2008 du groupe PCR IIc associé au sérovar 3c et au profil *AscI/ApaI* 301006/301006 laissait présager l'apparition d'un signalement ce qui fut le cas en 2009. Le sérovar 3c est rarement associé à des cas d'infections humaines. Le nombre de signalements est comparable à 2005 et 2006. Rappelons que depuis août 2006, les critères de signalement ont été optimisés pour diminuer des investigations lourdes parfois inutiles (Cf. Chapitre 5.1.1.). Un signalement 2008 (L08/07) a été clôturé en 2009. Tous les autres signalements de 2009 ont été clôturés en 2009.

**Tableau 15 :** Synthèse des signalements effectués par le CNRL en 2008 et rappel des signalements ouverts en 2008 et clôturés en 2009.

Signalement	ancienne numérotation	Date du signalement	Date de clôture	Caractéristiques des souches		
				Groupe PCR	Profil AscI	Profil ApaI
L08/07	30/06/2008	30/06/2008	19/01/2009	IVb	210792	210792
L08/01	07/04/2008	07/04/2008	05/05/2008	IVb	200792	200792
L08/02	14/04/2008	14/04/2008	23/06/2008	IVb	011001	160602
L08/03	05/05/2008	05/05/2008	02/06/2008	IVb	210792	210792
L08/04	26/05/2008	26/05/2008	23/06/2008	IVb	220803	200792
L08/05	17/06/2008	17/06/2008	21/07/2008	IVb	200792	200792
L08/06	23/06/2008	23/06/2008	21/07/2008	IVb	151005	151005
L08/07	30/06/2008	30/06/2008	19/01/2009	IVb	210792	210792
L08/08	08/09/2008	08/09/2008	14/10/2008	IVb	151005	111206
L08/09	06/10/2008	06/10/2008	03/11/2008	IVb	200792	200792
L09/01	19/01/2009	19/01/2009	01/09/2009	IVb	200792	200792
L09/02	27/04/2009	27/04/2009	02/06/2009	IVb	011001	160602
<b>L09/03*</b>	<b>06/07/2009</b>	<b>06/07/2009</b>	<b>03/08/2009</b>	<b>IIa</b>	<b>241006</b>	<b>241006</b>
L09/04	06/07/2009	06/07/2009	10/08/2009	IVb	151005	151005
L09/05	10/08/2009	10/08/2009	14/09/2009	IVb	011001	160602
L09/06	01/09/2009	01/09/2009	26/10/2009	IVb	210792	210792
L09/07	14/09/2009	14/09/2009	28/12/2009	IVb	151005	111206
<b>L09/08*</b>	<b>14/09/2009</b>	<b>14/09/2009</b>	<b>09/11/2009</b>	<b>IIc</b>	<b>301006</b>	<b>301006</b>
L09/09	12/10/2009	12/10/2009	23/11/2009	IVb	151005	151005

\*, Nouveau profil de signalement depuis 2006

**Tableau 16 :** Signalements de listériose, signalement associé à des cas associés et des cas sporadiques, France, 2000-2009 (modifié de Goulet et coll., 2008)

Caractéristiques	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009
Nombre de signalements détectés	9	4	10	11	13	11	11	16	9	11
Nombre de cas appartenant à un signalement	53	21	70	78	88	65	98	106	58	87
Nombre de cas n'appartenant pas à un signalement	210	167	150	131	148	156	192	213	214	230

### 3.3.4 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. Depuis 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 2009, 485 souches (contre 642 en 2008 et 513 en 2007) comme environ en 2007 ont été adressées au CNRL dans le cadre des 332 (contre 280 en 2008 soit +16% d'augmentation, 198 en 2007 et contre 200 alertes produits en 2006) alertes produits déclenchées par la DGAI.

### **3.3.5 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 2009 pour *Listeria* et lors d'inspection.

### **3.3.6 ALERTE EUROPEENNE**

En 2009, le CNRL a été informé de deux alertes produits communautaires :

- Une alerte produit communautaire N°2009.0458 (alerte produit DGAI 2009/262) concernant du gorgonzola italien qui a été notifiée par le réseau RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed).
- Une alerte produit communautaire N°2009.1962 sur la présence de *L. monocytogenes* sur un lot de fromages fabriqué en Pologne.

### **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 2009 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 2009 et le 31 décembre 2009 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*.

→ En 2009, sur les 317 cas de listériose recensés par le CNRL au jour de ce rapport, **ces investigations demandées au CNRL par l'InVS ont concerné 70 cas répartis sur toute la France, soit 82 % (contre 77% en 2008, 65% en 2007 et 59% en 2006) des infections du système nerveux central identifiées par le CNRL en 2009.**

### **3.3.8 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, dépend de la bonne volonté des biologistes médicaux qui acceptent d'adresser leurs souches au CNRL. La collecte des données n'est donc pas exhaustive et est parfois retardée. Ce système participe à la mise en évidence de l'augmentation du nombre de cas et de distinguer les cas groupés dus à une souche unique. Il permet également de préciser un certain nombre de tendances (évolution des formes cliniques, caractéristiques des souches responsables de ces infections, etc.). Il reste cependant à comprendre la cause de l'augmentation récente du nombre de cas.

En 2009, le plus grand nombre de cas depuis 1995 a été rapporté. Ceci illustre la nécessité de poursuivre la 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.

## 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 (General) 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* et peut procurer une liste de références sur un sujet associé sur *Listeria* et/ou la listériose.

→ En 2009, par exemple, de nombreux étudiants ont demandé des copies d'articles sur les épidémies, les bactériophages ou des revues sur la listériose. On peut ici ajouter la participation au Réseau de Microbiologistes Médicaux (R2M) des cadres du CNRL afin de répondre le cas échéant à toutes questions spécifique sur la 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 ; communication à des congrès ; 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/cnr/listeria>) qui est régulièrement consulté. Ce site permet d'accéder à de nombreux documents utiles et téléchargeables, 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.

## 4.2.2 COURS ET CONFERENCES SUR INVITATION

En 2009, les collaborateurs du CNRL ont donné 3 cours sur le sujet :

- Cours sur « *Listeria monocytogenes* », ADRIA Développement de Quimper, formation continue « Bactéries pathogènes en alimentaire », Rennes, le 23/09/09, A. Leclercq.
- Cours sur les toxi-infections d'origine alimentaire et les *Listeria*, Institut Pasteur de Lille, Lille, Cours Techniciens en microbiologie, hygiène et sécurité des aliments, le 25/03/09, A. Leclercq.
- Cours sur les *Listeria*, Institut Pasteur de Lille, Lille, Cours Le point sur les principaux microorganismes pathogènes, 23/06/09, 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 2009, nous avons accueilli un stagiaire, le Dr R. Drali (Responsable du laboratoire de typage moléculaire, Institut Pasteur d'Alger, Algérie), ayant effectué un stage dans le cadre de la mise au point d'un système de surveillance microbiologique en Algérie par la construction d'une base de typage moléculaire PFGE des souches humaines et alimentaires algériennes.
- ➔ En Janvier 2009, un responsable du CNRL a été aidé l'Institut Pasteur de Dakar au Sénégal pour son activité sur les *Listeria monocytogenes* dans les aliments et l'environnement.
- ➔ En 2009, les responsables du CNR *Listeria* ont encadré deux étudiants:
  - Solène Grayo, Thèse de Doctorat de l'Université PARIS 7, « Mécanismes moléculaires de la traversée de la barrière placentaire par *Listeria monocytogenes* », 18 Décembre 2009, Paris (Directeur de Thèse : M. Lecuit).
  - Jodie Lopez, M2Pro Diagnostic microbiologique : « Approche innovantes », Université Paul Sabatier de Toulouse III, « Analyse de la structure des populations de *Listeria monocytogenes* sur un échantillon mondial », Septembre 2009, Toulouse (Directeur de M2Pro : M. Lecuit & V. Chenal-Francisque)

#### **4.2.4 DEMANDE D'INFORMATIONS ET DE CONSEILS**

Devant un nombre croissant de sollicitations par courrier électronique et par téléphone, nous avons recensé et détaillé les demandes par e-mail ([listeria@pasteur.fr](mailto:listeria@pasteur.fr)) et les appels téléphoniques pour l'année 2009.

Nous avons reçu plus de 320 messages par courrier électronique sur l'ensemble de l'année 2009 (~40/semaine) et 490 appels téléphoniques (~9/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  $\beta$ -lactamines).

##### **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. 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 antibio-prophylaxie en cas de situation à risque

notamment chez une femme enceinte et des traitements en cas de formes neuroméningées.

L'analyse des principales demandes sera poursuivie sur l'année 2010. 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 2009, le CNRL a reçu des souches isolées de patients, 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 2.3.3.).

Le CNRL a également reçu 218 souches d'origine environnementale et/ou alimentaire (contre 183 en 2008, soit +19%, et 107 en 2007), adressées par des laboratoires d'hygiène et de contrôle des aliments pour leur identification et leur caractérisation (cf. chapitre 3.2.).

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

En 2009, les responsables du CNRL ont contribué à la révision des normes internationales et européennes pour les *Listeria* en microbiologie des aliments et sur une harmonisation européenne des méthodes de groupage PCR et de typage moléculaire des *L. monocytogenes*.

Enfin, ils ont conseillé des industriels sur des projets de développement de kits commerciaux pour *L. monocytogenes* et ont reçu 3 responsables Recherche et Développement pour un appui technique sur des kits de diagnostics.

#### ***Expertise de publications***

En 2009, le CNRL a participé à la relecture et a été membre de comité de rédaction de journaux tel qu'Eurosurveillance, PLoS pathogens, Clinical Microbiology and Infection, Journal of Food Protection, International Journal of Food Microbiology, Journal of Analytical Methods, etc. Dans ce cadre, 12 publications sur *L. monocytogenes* ont été examinées en 2009.

#### ***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 ISO TC34, 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 argumenté par le CNRL.

### ***Conseil auprès de Ministère***

En 2009, le CNRL a conseillé la DGAI et les DASS et les CLIN 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 du rapport sur saisine 2008-SA-0174 « Augmentation des cas de listériose et lien éventuel avec l'évolution des modes de production, de préparation et de consommation des aliments ». Ce document a été réalisé sous la coordination AFSSA-DERNS, F. Gauchard entre l'AFSSA-LERQAP, A. Beaufort, l'InVS, V. Goulet et le CNRL, A. Leclercq, approuvé par le Comité d'Experts spécialisés de l'AFSSA Microbiologie, et publié sur le site de l'AFSSA en février 2010 à l'adresse <http://www.afssa.fr/Documents/MIC-Ra-ListerioseAliments.pdf>.

## **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 données 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 participé, à la publication d'un article de vulgarisation destiné à la communauté médicale (Charlier-Woerther C et al. La Revue du praticien. 2009 Sep 20;59(7):905-11.), et avec l'AFSSA à la publication d'un rapport sur l'augmentation des cas.

### *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 2009, le rapport d'activité pour l'année 2008 a été mis en ligne sur notre site web (Adresse <http://www.pasteur.fr/sante/clre/cadrechr/listeria/web-CNRListeria2008.pdf>) et adressé à tous les institutionnels investis dans la surveillance de la listériose ainsi qu'à toute personne en faisant la demande.

## 5 LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

### 5.1 PUBLICATIONS NATIONALES

- Charlier-Woerther C, Leclercq A, Lortholary O, Lecuit M. 2009. Listériose, une infection d'origine alimentaire rare mais grave. **La Revue du praticien**. **59**:905-11.
- Fayol L, Beizig S, Le Monnier A, Lacroze V, Simeoni U. 2009. Méningite néonatale à *Listeria monocytogenes* après traitement maternel de 3 semaines pendant la grossesse. **Arch Pediatr**. **16**:353-6.
- Lecuit M. 2009. Traversée de la barrière placentaire par *Listeria monocytogenes*. **Arch. Pediatr**. **16** :932-3.
- Anonyme (Goulet V, Beaufort A, Gauchard F, Leclercq A). 2009. Avis sur l'augmentation des cas de listériose et le lien éventuel avec l'évolution des modes de production, de préparation et de consommation des aliments. **Rapport Afssa**, Janvier 2010.

### 5.2 PUBLICATIONS INTERNATIONALES

- Cordano AM, Jacquet C. 2009. *Listeria monocytogenes* isolated from vegetable salads sold at supermarkets in Santiago, Chile: prevalence and strain characterization. **International journal of food microbiology**. **132**:176-9.
- Disson O, Nikitas G, Grayo S, Dussurget O, Cossart P, Lecuit M. 2009. Modeling human listeriosis in natural and genetically engineered animals. **Nature protocols**. **4**:799-810.
- Guillet C, Join-Lambert O, Le Monnier A, Leclercq A, Mechai F, Mamzer-Bruneel MF, Bielecka MK, Scortti M, Disson O, Patrick Berche, Vazquez-Boland J, Lortholary O, Lecuit M. 2009. Human listeriosis caused by *Listeria ivanovii*. **Emerging infectious diseases**. **16**:136-8.
- Leclercq A, Clermont D, Bizet C, Grimont PA, Le Fleche-Mateos A, Roche SM, Carmen Buchrieser, Véronique Cadet-Daniel, Alban Le Monnier, Marc Lecuit and Franz Allerberger. 2009. *Listeria rocourtiae* sp. nov. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**. 2009 Nov 13.
- Roche SM, Kerouanton A, Minet J, Le Monnier A, Brisabois A, Velge P. 2009. Prevalence of low-virulence *Listeria monocytogenes* strains from different foods and environments. **International journal of food microbiology**. **130**:151-5.



### 5.3 COMMUNICATIONS NATIONALES

- **14<sup>ème</sup> colloque sur le Contrôle Epidémiologique des maladies Infectieuses, SPLIF (Groupe communication, alerte sanitaire, prévention et société)**, Institut Pasteur, Paris. 14 Décembre 2009. A. Leclercq. Communication orale « *Personnes âgées et listériose : Bilan et perspectives* ». (Adresse web du diaporama : [www.Infectiologie.com](http://www.Infectiologie.com))
- **29 réunion interdisciplinaire de chimiothérapie infectieuse RICAI 2008, Palais des Congrès, Paris. 3-4 décembre 2009.** Communication orale. H. Dieye, A. Leclercq, T. Cantinelli, S. Grayo, M. Lecuit. « Gastroentérite fébrile et septicémique à *Listeria monocytogenes* ». Abstract 124/31.
- **29 réunion interdisciplinaire de chimiothérapie infectieuse RICAI 2008, Palais des Congrès, Paris. 3-4 Décembre 2009.** Communication orale. A. Le Monnier, A. Leymarie, M. Ragon, E. Laurent, A. Leclercq, M. Lecuit, V. Goulet. « Evolution de la listériose materno-néonatale en France de 1984 à 2006 ». Abstract 125/31.
- **9<sup>ème</sup> colloque BioMérieux de microbiologie alimentaire, Maison de la RATP, Paris, 20 Octobre 2009.** Communication orale. A. Leclercq, “Evolution de la listériose face à la réglementation”.

### 5.4 COMMUNICATIONS INTERNATIONALES

- **Fifth European Symposium on Food Safety of the International Association for Food Protection.** Berlin (Allemagne) 7-9 Octobre 2009. Communication orale en partenariat avec l'ECDC, "*Overview of listeriosis in the EU*". Round table on "*Dealing with global Regulations, The Listeria Case.*"

### 5.5 CONFERENCES SUR INVITATIONS

- **Second annual meeting of the Food and waterborne diseases (FWD) network in Europe.** ECDC, Malte, Malte. 1-2 Octobre 2008. Participation au groupe *Listeria* en collaboration avec l'InVS.
- **Annual meeting of the International Organisation for Standardization and European Committee for Standardization for food Microbiology.** ANIA, Valence, Espagne, 4-8 Mai 2009. Présidence du CEN TC275/WG6 et participation à la révision des normes de la série EN ISO 11290 sur *Listeria* spp. et *L. monocytogenes* dans les aliments.

## 6 PROGRAMME D'ACTIVITE POUR LES ANNEES 2010-2011

Outre les activités de surveillance de la listériose en routine et la continuité des activités de recherche effectuées en 2010, le programme de travail plus spécifique aux activités d'Expertise du CNRL pour les années 2010-2011 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*.

↳ En 2010, le CNRL souhaiterait proposer à la cellule *Listeria* de faire évoluer la nomenclature des souches sur un identifiant unique regroupant l'espèce (M = *monocytogenes*, I = *innocua*, IV = *ivanovii*, S = *seeligeri*, W = *welshimeri*, G = *grayi*, R = *rocourtiae*, Mi = *marthii*), le groupe PCR et le profil combiné PFGE *AscI/ApaI*.

*Par exemple, la souche M-IIc-301006/301006 est une souche de Listeria monocytogenes de groupe PCR IIc de profil PFGE AscI 301006 et de profil PFGE ApaI 301006 ce qui simplifierait les écritures lors de la surveillance nationale.*

### *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 ;
- 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*.

## 7 CONCLUSION GENERALE

En 2009, le nombre de cas de listériose déclarés en France a augmenté par rapport à 2008 (322 cas ; +18%). Cette augmentation concerne notamment les formes materno-néonatales. Il s'agit du nombre de cas de listérioses le plus élevé depuis 1995, et l'augmentation observée depuis 2006 se maintient donc en 2009. Il est prématuré à ce stade de conclure que l'augmentation observée en 2009 par rapport aux trois années précédentes est significative. Il est important de souligner que cette augmentation s'inscrit dans un contexte d'augmentation comparable au niveau européen, sans que la cause en ait été identifiée à ce jour. En lien avec l'AFSSA et l'InVS, le CNRL a participé à la rédaction d'un rapport sur ce sujet (<http://www.afssa.fr/Documents/MIC-Ra-ListerioseAliments.pdf>). Le taux de mortalité de 25 à 30% associé à cette maladie, souligne l'importance de la surveillance de la listériose humaine, domaine dans lequel l'expertise du CNRL est reconnue internationalement. Le CNRL a été sollicité par les autorités sanitaires françaises pour la gestion d'alertes sur des produits contaminés en France et dans des pays tiers ainsi que par les autorités sanitaires autrichiennes dans le cadre d'une épidémie. Il a également aidé des investigateurs algériens et portugais à la mise en place d'un système de surveillance. Le CNR des *Listeria*, devant être à même de poursuivre son activité en cas de déclenchement du plan de pandémie grippale H1N1, s'est préparé à une autonomie de fonctionnement sur 12 semaines en 2009.

Le CNR des *Listeria* poursuit ses efforts afin d'améliorer le diagnostic des cas de listériose, la détection des cas groupés et l'identification de la source de contamination, en lien constant avec l'InVS et les autres partenaires de la cellule *Listeria*. Cette année, le CNRL a optimisé les modalités diagnostiques des gastroentérites à *L. monocytogenes* et approfondi la compréhension de cette forme clinique dont l'incidence est probablement sous-estimée. Le CNRL a également participé à la mise en évidence de l'implication d'une autre espèce de *Listeria*, *L. ivanovii*, dans des cas de listériose humaine (Guillet C. et coll., 2009. Emerg Infect Dis), et a décrit une nouvelle espèce de *Listeria* non pathogène, *Listeria rocourtiae* (Leclercq et coll., 2009. Int J Syst Evol Microbiol).

La caractérisation moléculaire des souches de *Listeria* est primordiale pour l'investigation des cas groupés et des épidémies, ainsi que l'identification du véhicule alimentaire à l'origine des cas humains. Elle permet de plus d'analyser la biodiversité de ce genre bactérien. Cette année, le CNR *Listeria*, en collaboration avec la Plate-Forme de Génotypage des Pathogènes et Santé Publique (PF8), a mis au point un schéma de caractérisation des souches selon la méthode MLVA (Multi Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis). Il a également conduit une étude phylogénétique par Multilocus Sequence Typing (MLST) à partir de souches originaires des 5 continents, afin d'étudier de façon la plus exhaustive possible la biodiversité et l'évolution de l'espèce *Listeria monocytogenes*.

En lien avec le groupe Microorganismes et barrière de l'hôte, auquel il est rattaché, le CNRL participe également à l'étude de la physiopathologie de la listériose. Par ailleurs, dans le cadre de collaborations scientifiques au sein de l'Institut Pasteur et extérieurs, le CNRL poursuit ses travaux visant (i) à améliorer l'identification et la caractérisation des souches (détection des principaux facteurs de virulence, étude de la biodiversité et de la structure génétique des espèces du genre *Listeria* et de leur évolution), (ii) à mieux comprendre la physiopathologie de la listériose humaine et (iii) 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 2009a. 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<sup>ème</sup> édition, 2008, Paris
- Anonyme. 2009. Avis sur l'augmentation des cas de listériose et le lien éventuel avec l'évolution des modes de production, de préparation et de consommation des aliments. Rapport Afssa, Janvier 2010.
- 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.
- Charlier-Woerther C, Leclercq A, Lortholary O, Lecuit M. 2009. Listériose, une infection d'origine alimentaire rare mais grave. *La Revue du praticien.* 59:905-11.
- 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.
- Cordano AM, Jacquet C. 2009. *Listeria monocytogenes* isolated from vegetable salads sold at supermarkets in Santiago, Chile: prevalence and strain characterization. *Int. J. Food Microb.* 132:176-9.
- 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.
- Disson O, Nikitas G, Grayo S, Dussurget O, Cossart P, Lecuit M. 2009. Modeling human listeriosis in natural and genetically engineered animals. Nature protocols. 4:799-810
- 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.

Fretz R, Sagel U, Ruppitsch W, Pietzka A, Stoger A, Huhulescu S, Heuberger S, Pichler J, Much P, Pfaff G, Stark K, Prager R, Flieger A, Feenstra O, Allerberger F. Listeriosis outbreak caused by acid curd cheese Quargel, Austria and Germany 2009. *Euro Surveill.*, 2010, 15(5). pii: 19477.

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., Ojienyi 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.

Guillet C, Join-Lambert O, Le Monnier A, Leclercq A, Mechai F, Mamzer-Bruneel MF, Bielecka MK, Scorti M, Disson O, Patrick Berche, Vazquez-Boland J, Lortholary O, Lecuit M. 2009. Human listeriosis caused by *Listeria ivanovii*. Emerging infectious diseases. 16:136-8

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.

Leclercq A, Clermont D, Bizet C, Grimont PA, Le Fleche-Mateos A, Roche SM, Carmen Buchrieser, Véronique Cadet-Daniel, Alban Le Monnier, Marc Lecuit and Franz Allerberger. 2009. *Listeria rocourtiae* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microb.. 2009 Nov 13.

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.

Roche SM, Kerouanton A, Minet J, Le Monnier A, Brisabois A, Velge P. 2009. Prevalence of low-virulence *Listeria monocytogenes* strains from different foods and environments. Int. J. Food Microbiol. 130:151-5

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 phago var characteristics. Lancet, 1989, 334, 1217-1218.

Rocourt J., Grimont F., Grimont P.A.D., Seeliger H.P.R. DNA relatedness among sérovars 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 Clément 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.

Scortti, 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.