



DATE : Avril 2012

MARC LECUIT
ALEXANDRE LECLERCQ



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. 2012. Rapport annuel d'activité du Centre national de Référence des Listeria – Année 2011. Institut Pasteur, Paris, France) dont elles sont issues.

Avant-propos

Le Centre National de Référence des *Listeria* remercie l'ensemble de ses correspondants et partenaires pour l'envoi en 2011 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

1	INTRODUCTION	9
1.1	Personnel permanent	13
1.1.1	Organigramme général et organisation	13
1.1.2	Effectif	14
1.2	Locaux.....	15
1.3	Equipement	16
1.4	Mise en place de la démarche de management de la Qualité et hygiène/sécurité au sein du CNRL	17
1.5	Plan de continuité d'activité.....	19
2	ACTIVITES D'EXPERTISE DU CNR DES <i>LISTERIA</i>	20
2.1	Capacités techniques, rôles et missions du CNR des <i>Listeria</i>	20
2.1.1	Identification et caractérisation des souches de <i>Listeria</i>	20
2.1.1.1	Méthodes et marqueurs épidémiologiques disponibles	20
2.1.1.2	Techniques développées en 2011.....	23
2.1.1.3	Méthodes en développement	23
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 : Multicentric Observational National Analysis of LISterosis and <i>Listeria</i>	26
2.1.1.4.2	Souches nécessaires à la validation des kits de microbiologie	26
2.1.2	Maintien, détention et diffusion de matériel biologique	26
2.1.2.1	Les souches bactériennes.....	26
2.1.2.2	Les serums	29
2.1.2.3	Les bactériophages.....	29
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 trousses	38
2.1.5	Techniques transférées vers d'autres laboratoires.....	38
2.1.6	Gestion, protection et sauvegarde de la base de données du CNRL.....	38
2.2	Surveillance de la listériose humaine en France	39
2.2.1	Surveillance microbiologique de la listériose en France.....	41
2.2.2	Surveillance et signalement.....	43
2.2.3	Phase de surveillance renforcée.....	44
2.2.4	Phase d'Alerte	44
2.2.5	Surveillance de la résistance aux antibiotiques	45
2.2.6	Détection et analyse des infections nosocomiales	46
2.3	Contribution ou collaboration aux instances et systèmes de surveillance nationaux, européens et internationaux.....	47
2.3.1	InVS.....	47
2.3.2	ANSES et LNR <i>Listeria monocytogenes</i>	47
2.3.3	DGS – DGAL –DGCCRF	48
2.3.4	Laboratoire de Référence des <i>Listeria monocytogenes</i> de l'Union Européenne	48
2.3.5	European Center for Diseases Control: ECDC.....	49
2.3.6	Agence de la Santé Publique du Canada	50
2.3.7	EC Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF).....	50
2.3.8	Centre Collaborateur OMS (CCOMS).....	51
3	ACTIVITES DE SURVEILLANCE.....	52
3.1	Données de la surveillance microbiologique de la listériose humaine	52
3.1.1	Cas de listériose en France.....	52

3.1.1.1	Définition de cas.....	52
3.1.2	Analyse globale des cas de listériose.....	53
3.1.3	Cas de listériose en France métropolitaine	56
3.1.3.1	Distribution temporelle des cas.....	57
3.1.3.2	Distribution des cas selon la forme clinique.....	61
3.1.3.3	Distribution des souches selon le groupe PCR	70
3.1.4	Cas de listériose dans les DROM-TOM	75
3.1.5	Etude de la résistance aux antibiotiques.....	76
3.1.6	Typage moléculaire des souches par macrorestriction d'ADN	77
3.2	Caractérisation des souches d'origine non humaine	81
3.2.1	Analyse générale.....	81
3.2.2	Souches isolées d'aliments	84
3.2.2.1	Catégories de laboratoires ayant adressé les souches.....	84
3.2.2.2	Nombre de souches et distribution par espèce.....	85
3.2.2.3	Distribution des souches de <i>L. monocytogenes</i> par catégorie d'aliments	86
3.2.2.4	Distribution des souches de <i>L. monocytogenes</i> par groupe PCR	86
3.2.2.5	Distribution des souches de <i>L. monocytogenes</i> par profils de macrorestriction	88
3.2.3	Souches isolées de l'environnement	89
3.3	Bilan des investigations, signalements et alertes	90
3.3.1	Suspensions d'infections nosocomiales	90
3.3.2	Investigation d'une TIAC.....	90
3.3.3	Signalements	91
3.3.4	Alertes Produits DGAL.....	92
3.3.5	Alertes Produits DGCCRF	93
3.3.6	Alerte Européenne	94
3.3.7	Coopération des systèmes de surveillance France-belgique dans le cadre d'une épidémie belge	94
3.3.8	Enquête des formes neuroméningées et autres formes.....	94
3.3.9	Conclusions.....	96

4	ACTIVITES D'INFORMATION, DE FORMATION ET DE CONSEIL	97
4.1	Site Internet	97
4.2	Cours et conférences sur invitation	97
4.3	Formation et encadrement.....	98
4.3.1	Demande d'informations et de conseils.....	98
4.4	Expertises	99
4.5	Retour d'informations	101
5	TRAVAUX DE RECHERCHE EN LIEN DIRECT AVEC L'ACTIVITE DU CNRL.....	102
5.1	Contributions aux études épidémiologiques	102
5.1.1	Synthèse sur la surveillance de <i>Listeria monocytogenes</i> dans les aliments.....	102
5.1.2	Listériose humaine : situation en France et en Europe.....	103
5.1.3	Encéphalites à <i>Listeria monocytogenes</i> en France.....	103
5.1.4	Etude des formes materno-foetales.....	104
5.1.5	Optimisation de la surveillance nationale de la listériose	105
5.1.6	Publications de cas cliniques français en partenariat avec des laboratoires correspondants	105
5.1.6.1	Cas groupés de listérioses neuroméningées en Touraine.....	105
5.1.6.2	Abcès cérébral à <i>Listeria monocytogenes</i> de localisation inhabituelle	106
5.1.6.3	<i>Listeria monocytogenes</i> : une complication rare de dérivation ventriculo péritonéale chez des enfants	106
5.2	Méthodes de diagnostic et atypies des souches.....	107
5.2.1	Profil atypique de sérogroupe PCR de <i>L. monocytogenes</i>	107
5.2.2	Etude de souches hypovirulentes et avirulentes	107
5.3	Taxonomie, nouvelles espèces de <i>Listeria</i>	107
5.4	Développement de nouveaux outils de diagnostic.....	108
5.4.1	Utilisation du gène <i>iap</i> pour l'identification des <i>Listeria</i>	108
5.5	Développement de nouveaux outils de typage moléculaire et étude de la diversité génotypique et phénotypique des <i>Listeria</i>	108
5.5.1	Analyse de la structure des populations de <i>L. monocytogenes</i> sur un échantillonnage mondial par Multilocus Sequence Typing of <i>Listeria</i>	108
5.5.2	Etude de la résistance aux antibiotiques.....	109

5.6	Investigation des infections ostéo-articulaires et de formes atypiques de listériose	110
6	LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS.....	111
6.1	Publications nationales	111
6.2	Publications internationales	111
6.3	Communications nationales	112
6.4	Communications internationales	112
6.5	Conférences sur invitations	113
	CONCLUSIONS GENERALES.....	115
	Références citées.....	117

RESUME DE L'ANNEE 2011

En 2011, le nombre de cas de listériose déclarés en France a été de 283 cas (-9% par rapport à 2010). Cette légère diminution concerne notamment les formes materno-néonatales et neuroméningées. Ce chiffre reste élevé, relativement stable depuis 2007, année qui s'inscrivait en nette augmentation par rapport aux années 1995-2005. Une situation similaire est observée dans d'autres pays européens. L'augmentation constatée depuis 2007 n'a pas de cause identifiée à ce jour. Le taux de létalité 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. En 2011, une TIAC à *Listeria monocytogenes* a été investiguée, il s'agit d'un phénomène inhabituel et donc à surveiller. Le CNRL a participé à la diffusion au grand public et aux professionnels des informations sur *Listeria monocytogenes* en participant activement à l'établissement de la fiche de danger sur cette bactérie qui sera mise en ligne par l'ANSES. Le CNRL a été sollicité par les autorités sanitaires françaises pour la gestion d'alertes sur des produits contaminés en France et dans le cadre d'une épidémie en Belgique dont l'investigation a été facilitée par les données du système de surveillance français. Sur décision de la cellule *Listeria* fin 2010, une optimisation de la surveillance nationale a été mise en place en 2011 en simplifiant les tableaux hebdomadaires de surveillance.

Le CNR des *Listeria* participe à l'amélioration du diagnostic de listériose, à la détection des cas groupés et à l'identification de la source de contamination, en lien avec l'InVS et les autres partenaires de la cellule *Listeria*. Le CNRL a ainsi participé à l'évaluation de la spectrométrie de masse (MALDI-TOF) pour l'identification des bactéries à Gram positif et d'une nouvelle PCR en temps réel pour la détection de *L. monocytogenes* sur le LCR pour leurs utilisations potentielles par les LABM français.

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 validé un schéma de caractérisation des souches selon la méthode MLVA (Multi Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis). Il a également finalisé son étude phylogénétique par Multilocus Sequence Typing (MLST) à partir de souches originaires des 5 continents, afin d'étudier de façon la plus exhaustive la biodiversité et l'évolution de l'espèce *Listeria monocytogenes*. Il a démontré que les clones majeurs avaient une distribution ubiquitaire. Cette méthode est aujourd'hui utilisée par d'autres laboratoires de référence européens et dans le monde.

Afin de mieux caractériser les formes cliniques de la listériose, préciser les modalités diagnostiques et thérapeutiques et identifier des facteurs de risque et pronostiques, le CNRL participe à l'étude prospective cas-témoins MONALISA (clinical trials NCT01520597). Financée principalement par le programme hospitalier de recherche clinique national (PHRC), elle permettra d'avancer dans la compréhension de cette infection sévère. Le CNRL a également publié la première série de listériose ostéo-articulaire, forme rare de cette infection.

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. Dans le cadre de collaborations, 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 létalité 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 ainsi qu'en 2011 avec l'épidémie de cantaloupe aux USA (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 ; McLaughlin 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 par arrêté du 26 décembre 2011.

Les missions spécifiques du CNRL définies dans son cahier des charges 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, ANSES, 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 interactions avec le Laboratoire National de Référence des *Listeria monocytogenes* (LNRI, ANSES-LSA) afin d'optimiser le recueil des informations nécessaires et les méthodes de 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 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. Depuis 2007, cette incidence est stable autour de 5 cas/million d'habitants (Goulet et coll., 2008). En 2011, l'incidence constatée est de 4,4 cas par million d'habitants, soit en légère diminution par rapport à 2010.

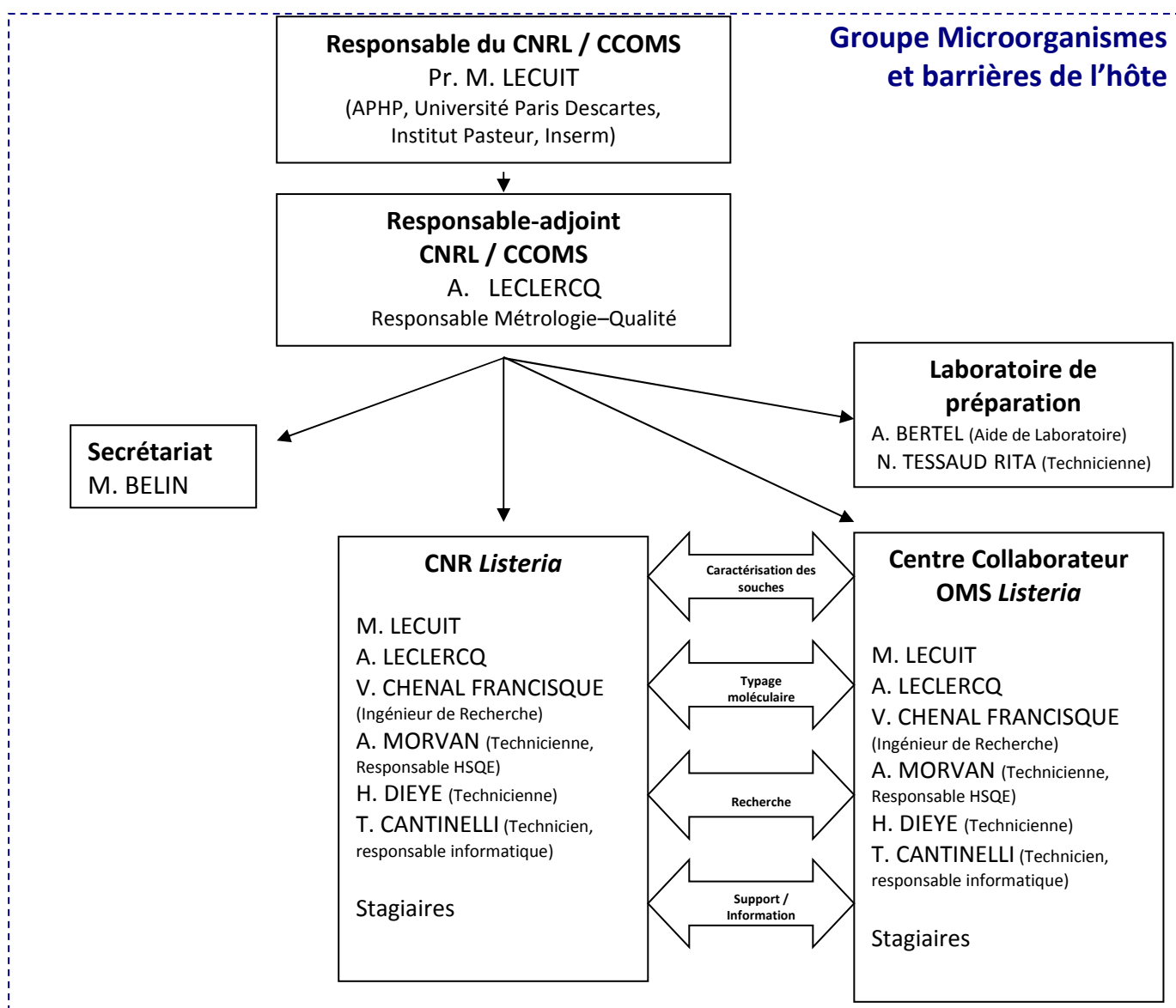
Le laboratoire hébergeant le CNRL est également Centre Collaborateur de l'OMS (Mandat renouvelé en Novembre 2011) et participe à la surveillance de cette infection dans les pays qui en font la demande.

1.1 PERSONNEL PERMANENT

1.1.1 ORGANIGRAMME GENERAL ET ORGANISATION

L'Institut Pasteur héberge depuis 1993 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 des *Listeria* (CCOMS). C'est en 2008 que le Groupe « Microorganismes et Barrières de l'hôte » les hébergera spécifiquement.

Figure 1 : Organigramme Général du Personnel du CNR *Listeria*



Le Groupe Microorganismes et barrières de l'hôte qui héberge le CNRL bénéficie du cadre favorable offert par l'Institut Pasteur, qui possède une structure administrative coordonnant l'activité des CNRs placés sous la responsabilité de l'Institut Pasteur, qui héberge différentes unités de recherche travaillant sur *Listeria* et d'autres bactéries entéropathogènes, et des plates-formes technologiques diverses lui permettant un accès privilégié à un très large panel de techniques à haut débit et de grande technicité.

Le CNRL est également en contact constant avec un réseau de 665 biologistes français et l'ensemble des laboratoires vétérinaires départementaux, de la DGCCRF, des laboratoires privés d'hygiène des aliments (environ 262 correspondants).

En cas de crise sanitaire, le CNRL est en mesure de réceptionner des souches 24h/24h, 7j/7j, et peut bénéficier d'un renfort en personnel auprès de la cellule d'intervention biologique d'urgence (CIBU) de l'Institut Pasteur par des techniciens habilités aux méthodes du CNRL.

1.1.2 EFFECTIF

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

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

Nom – Prénom	Libellé Emploi
LECLERCQ Alexandre	Cadre A confirmé – Responsable-Adjoint
CHENAL FRANCISQUE Viviane	Ingénieur 2
MORVAN Anne	Technicienne supérieure de laboratoire Échelle 6
CANTINELLI Thomas	Technicien supérieur de laboratoire Échelle 5
DIEYE Hélène (CDD)	Technicienne supérieure de laboratoire Échelle 5
BELIN Martine	Secrétaire Échelle 4
RITA TESSAUD Nathalie	Technicienne de laboratoire Échelle 3
BERTEL Arnaud	Aide de Laboratoire Échelle 3

Le responsable du CNRL est Marc Lecuit, 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*.

Les deux responsables du CNRL possèdent respectivement une expertise médicale clinique et microbiologique (M. Lecuit) et une expertise en microbiologie et sécurité sanitaire des aliments (A. Leclercq).

Pour le reste de son activité, le personnel du CNR est financé sur les fonds propres de l'Institut Pasteur en absence de conflits d'intérêt (DPI des responsables du CNR des *Listeria*).

→ En 2011, les techniciens se sont formés à de nouvelles techniques comme la biologie cellulaire et l'analyse de génome afin de pouvoir faire face à l'étude d'un clone épidémique en période de crise sanitaire.

1.2 LOCAUX

Laboratoires et bureaux:

Le CNRL est hébergé à l'Institut Pasteur au second étage du bâtiment Roux (53A) de l'Institut Pasteur, 25 rue du Dr. Roux, 75015 Paris.

Les pièces suivantes (sur 70 m² environ) sont dédiées à l'activité du CNRL ainsi qu'au Centre collaborateur de l'OMS *Listeria* (CCOMS) :

Pièces du CNRL :

Pièce 6A: Bureau de l'Ingénieur de recherche du CNRL/CCOMS, partagée avec un(e) étudiant(e) 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 L2, 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 les collections 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 d'un suivi continu des températures).

Matériel, équipements utilisés

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

Equipements partagés

- 1 autoclave,
- 1 machine à laver la vaisselle,
- 1 autopréparateur de milieux de culture,
- 1 inoculateur multipoint partagé avec le CNR de la résistance aux antibiotiques
- 1 système de prises de vues photographiques couplé à un ordinateur
- 1 machine à glace,
- 1 balance de précision,
- 1 photocopieuse-scanner,
- 1 thermocycleur temps réel partagé avec d'autres CNRs

Equipement informatique

L'ensemble des équipements informatiques (7 ordinateurs, 2 imprimantes) est en location et géré 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. Le parc informatique est renouvelé tous les 4 ans.

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

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 au CNRL pour leur identification et leur caractérisation. Outre le management de la qualité, l'établissement des documents qualité et leur application permet une traçabilité totale des essais réalisés au CNRL, ce qui constitue un atout en cas de problème juridique ou de saisie des documents techniques dans le cadre d'une procédure juridique. Enfin, ils assurent un système de codification et d'anonymisation des échantillons et des données des patients pour en assurer la confidentialité et la protection en complément des procédures de l'infrastructure informatique visant au traitement automatisé des données à caractère personnel.

Le CNRL s'est engagé depuis 1996 dans une démarche de management de la Qualité concernant l'organisation et les analyses qu'il effectue. 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 référentiel. Depuis 2007, le responsable adjoint au CNRL en charge du Management de la Qualité a révisé la majorité des documents qualité et a créé un manuel qualité en relation avec le système qualité de l'Institut Pasteur dans le but du passage à l'évaluation par le COFRAC selon le référentiel NF EN ISO CEI 17025.

Cette démarche particulière du CNRL a rejoint une démarche d'harmonisation des systèmes de management qualité des CNRs à l'Institut Pasteur de 2008 à aujourd'hui, en réponse aux inspections AFSSAPS relatives à la conformité aux exigences des arrêtés du 30 juillet 2004 et du

16 juillet 2007 liés aux micro-organismes et toxines. Une politique Qualité, Sécurité, Environnement pour l'Institut Pasteur a été formalisée, validée par la Direction Générale et communiquée à l'ensemble du personnel en 2008 et mise à jour en 2011.

En 2010, suite à l'évolution du cadre réglementaire de l'accréditation des laboratoires d'analyses médicales, le CNRL a été conduit à confirmer en deuxième intention des résultats de première intention de laboratoires accrédités NF EN ISO 15189. Ainsi, pour faciliter ses échanges avec ses correspondants, le CNRL doit avoir un système qualité dans la continuité de celui de ses correspondants. Le CNRL s'est engagé à 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.

Plus particulièrement, la Direction déléguée Environnement-Sécurité-Logistique (ESL) a formalisé et mis à disposition des CNR les procédures qualité d'organisation, de pilotage et d'amélioration nécessaires dans le cadre des démarches selon les référentiels ISO. Elle apporte également ses ressources et son expertise pour accompagner les CNR dans leur projet d'accréditation partielle (envoi des actes de candidatures pour l'accréditation avant le 31/10/2012 et obtention de l'accréditation partielle avant le 31 mai 2013) et complète (avant le 1/11/2016) conformément à l'ordonnance du 13 janvier 2010 relative aux activités de biologie médicale.

→ Les lignes d'essais, cœur de l'activité technique du CNRL, qui seront soumises au projet d'accréditation du CNRL sont 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 *Ascl* (Protocole Pulsenet Europe)

Le CNRL souhaite conduire ces essais avec une reproductibilité, répétabilité, justesse et fidélité répondant à son cahier des charges et à la qualité reconnue de ses résultats.

Avancement de l'Assurance Qualité sur le CNR Listeria selon l'audit interne de 2011

Le service qualité de l'Institut Pasteur à travers ses audits internes a jugé que l'implication de l'équipe et le temps dédié par l'encadrement au management de la qualité a permis l'atteinte d'un niveau qualité satisfaisant.

L'encadrement de cette structure a mis en œuvre, pour son personnel technique, les moyens nécessaires à la mise en œuvre de la qualité pour les activités.

Cette organisation a permis la mise en place efficace d'une gestion documentaire de la qualité (procédures, modes opératoires et enregistrement) et d'une gestion du matériel, pour ses activités de diagnostic.

La gestion du matériel permet de garantir l'utilisation d'équipements fiables, appropriés aux besoins et surveillés en temps réel.

La gestion des réactifs et consommables (sélection et évaluation des fournisseurs, distribution et évaluation des produits) est assurée par le département Achats et le service Logistique.

Le CNRL assure la qualité de ces résultats d'essais par des témoins positifs et négatifs, des remises en analyse de souches et la participation à des essais d'intercomparaison si ils existent ou sont programmés.

En 2011, le CNRL a été sollicité par l'ECDC sur la possibilité de l'organisation d'un essai interlaboratoire au niveau des CNR et/ou LNR européens. Le CNRL participera en Janvier 2012 à un essai d'intercomparaison organisé par l'EU-RL *Listeria monocytogenes* sur le typage moléculaire PFGE financé pour les CNR par l'ECDC.

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 H1N1v, 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. Depuis 2009, le CNRL a mis en place une organisation minimale permettant d'assurer en continu une autonomie de fonctionnement humain, matériels et en source d'énergie sur 12 semaines avec sauvegarde du patrimoine crucial (Collections, etc.) et la mise en place de possibilité de télétravail (interface internet). Les cadres du CNRL ayant chacun des activités (Hospitalière ou CIBU) respectives sont disponibles pour participer à la gestion d'une pandémie. Le laboratoire du CNRL est prêt à mettre à la disposition de la CIBU une partie de ses locaux techniques pour réaliser des diagnostics et s'adapter en organisation à la situation.

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 européens et 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] et également des souches isolées d'aliments ou de l'environnement envoyées par les laboratoires d'hygiène et de contrôle des aliments publics agréés (LVD, LDA, SCL, Laboratoires privés, etc.) dans le cadre d'alertes produits de la Direction Générale de l'Alimentation (DGAI) ou de la Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes ou d'investigations autour de cas ou d'autocontrôles.

Ces souches font systématiquement l'objet des analyses suivantes:

- **Vérification de la pureté** des souches réceptionnées sur gélose nutritive. Si la souche envoyée est un mélange de souches, elle est isolée sur gélose sélective chromogène ALOA[®] (AES Laboratoire, France) et/ou Rapid'L. mono (bioRad, Marne la Coquette, France) et gélose au sang de cheval (bioMérieux, France).

- **Confirmation de l'identification du genre et de l'espèce** par microscopie et coloration de Gram, tests biochimiques [galerie API-*Listeria*[®] (bioMérieux, France)] et recherche du caractère hémolytique, 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 cas de difficultés d'identification d'une souche envoyée par un correspondant, le CNRL effectue une amplification génique et un séquençage sur environ 1400 pb du gène codant les ARNr 16S. Cette activité permet le cas

échéant d'identifier de nouvelles espèces de *Listeria*, comme ce fut le cas pour *L. rocourtiae* en 2009 et de la suspicion d'une nouvelle espèce en 2011 en cours d'investigation. Toutes les souches non *Listeria* présentant des caractéristiques phénotypiques du genre sont expertisées par cette dernière méthode pour obtenir une identification définitive et assurer un rendu « Non *Listeria* » aux laboratoires correspondants pouvant être étayé par une identification moléculaire, et d'ainsi éviter une déclaration erronée aux autorités de santé publique.

- **Détermination du séro groupe PCR** selon la méthode publiée par le CNRL (Doumith et coll., 2004 et 2005) qui a remplacé la méthode classique de sérotypage depuis le 01/03/05. Cette « PCR multiplex » cible une partie de la séquence du gène *prs* présent dans l'ensemble des espèces décrites de *Listeria* et quatre autres gènes (*Imo1118*, *Imo0737*, *ORF2110*, *ORF2819*) spécifiques de *L. monocytogenes* permettant de déterminer le « 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 colonies confluentes de la souche réceptionnée sur gélose nutritive pour documenter la présence de *Listeria* et déterminer son séro groupe PCR.

- **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 *Ascl* et *Apal* selon le protocole international standardisé du CDC d'Atlanta et des réseaux PulseNet décrit par Graves *et coll.* en 2001 (Graves et Swaminathan, 2001). Dans certains cas, une troisième enzyme *SmaI* peut être utilisée selon la méthode interne développée par le CNRL afin d'augmenter le pouvoir discriminant de la PFGE. Ce 3^{ème} enzyme sert : (i) à différencier des profils très proches avec les enzymes *Ascl*/*Apal* (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 ayant les mêmes profils *Ascl* et *Apal* mais un profil *SmaI* différent afin de permettre à l'InVS d'établir des clusters d'investigations, d'écarter certains cas humains ou des produits alimentaires lors de l'étude d'éventuels cas groupés. En cas d'épidémie ou de crise, le CNRL peut multiplier par 2 sa capacité de typage par l'utilisation des équipements d'autres structures de l'Institut Pasteur et 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 de l'EUCAST. Ces antibiogrammes sont effectués sur un panel de 23 antibiotiques incluant notamment de nouvelles molécules récemment

commercialisées et/ou non testées auparavant. La résistance des souches détectées est authentifiée par la détermination de la CMI par E-test. Le mécanisme de résistance peut ensuite être étudié.

Des analyses complémentaires peuvent également être effectuées, dans le cadre de projets de recherche :

- **Analyse phylogénétique des souches.** Sur la base du schéma MLST que le CNRL a établi, les souches d'intérêt de *L. monocytogenes* peuvent être typées et leur appartenance à un complexe clonal déterminée rapidement. Ce typage permet de les positionner par rapport aux complexes clonaux qui ont déjà été à l'origine d'épidémies ou de cas groupés et de détecter une évolution des souches.

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

- **Séquençage du génome des souches** en collaboration avec la plate-forme de santé publique PF8.

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 2011, le CNRL a reçu un total de 1219 souches** dont 313 souches d'origine humaine, 594 souches d'origine alimentaire, 101 souches d'origine environnementale dans le cadre d'alertes sanitaires, d'investigations ou de demandes client, 1 souche d'origine vétérinaire, 1 souche sans information, 10 souches françaises de programme de recherche, et 199 souches de pays étrangers (Autriche (51) ; Suisse (113) ; Tunisie (11) ; Italie (10) ; Irlande (10) ; Australie (4)), dans le cadre des activités du CCOMS et de son étude sur la biodiversité des *L. monocytogenes* en partenariat avec le CNRL ou de son expertise en sérotypage de sérotype rare.

Attention, ces chiffres diffèrent parfois de ceux des chapitres suivants car la suite de ce rapport se rapporte aux souches isolées ou échantillons prélevés en 2011 et non celles pouvant être reçues en 2011 et 2012 et les souches de 2010 réceptionnées en 2011.

2.1.1.2 TECHNIQUES DEVELOPPEES EN 2011

En 2011, 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 impliquées 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).

Article en cours de rédaction

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 à l'étude tous les VNTR étudiés par les différents auteurs. 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 des amplimères des divers allèles identifiés a également été vérifiée. 11 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). Un schéma MLVA optimal a été obtenu à partir d'un jeu restreint de VNTR. Les performances de ce schéma MLVA, notamment quant à son pouvoir discriminant, ont été comparées à celles de trois autres méthodes de typage moléculaire (Géno-sérogroupe, PFGE, MLST) en 2011 et le schéma a été finalisé en 2012. Le but d'obtention d'une méthode de typage en 8 heures suivant l'extraction de l'ADN est atteint, ce qui constitue un gain de temps pour la surveillance, notamment dans le cadre de la gestion d'alertes sanitaires ou de signalement. Il conviendra ensuite de valider cette nouvelle méthode par essai interlaboratoire européen et d'investiguer son utilisation pour améliorer la surveillance microbiologique de la listériose en France.

En partenariat avec le Centre Hospitalier Sud Réunion (Dr A/ Michault), le CNRL a évalué la méthode HRM (High Resolution Melting) comme méthode de typage rapide de routine et résolutive, mais les résultats obtenus ne sont pas concluants.

Identification de Listeria par MALDI-ToF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time-Of-Flight)

Personnes impliquées au CNRL : A. Morvan - A. Leclercq - M. Lecuit

En collaboration avec la Collection de l'Institut Pasteur, l'Health Protection Agency (UK) et le service de microbiologie de l'Hôpital Necker-Enfants Malades.

*Article soumis à Journal of Clinical microbiology : E. Farfour, J. Leto, M. barritault, C. Barberis, J. Meyer, B. Dauphin, C. Vay, A.S. Le Guern, A. Leflèche, E. Badel, N. Guiso, A. Leclercq, A. Le Monnier, M. Lecuit, V. Rodriguez-Nava, E. Bergeron, Josette Raymond, S. Vimont, E. Carbonnelle, H. Guet-Revillet, H. Lecuyer, J.L. Beretti, P. Berche, A. Ferroni, X. Nassif, and O. Join-Lambert. *Evaluation of the Andromas MALDI-TOF MS system for identification of aerobically growing Gram-positive Bacilli.**

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 2011, ce travail a été initié sur les souches de référence et des isolats.

Les résultats de la publication soumise montrent que 98.5% et 1.2% des isolats bacilles Gram positifs non-*Listeria* ont été identifiés au niveau de l'espèce ou du genre, respectivement. Hormis les isolats de *L. grayi* qui sont bien identifiés à l'espèce, les autres souches de *Listeria* sont identifiées au genre du fait de la similarité de leurs spectres. Ces données démontrent qu'une identification rapide et un screening des bacilles Gram positifs pathogènes peut être obtenu avec un système commercial ANDROMAS sans étape d'extraction.

Amélioration de l'identification moléculaire des *Listeria*

Personnes impliquées au CNRL : T. Cantinelli - A. Leclercq - M. Lecuit

En collaboration avec le pôle d'identification bactérien de l'Institut Pasteur

Les *Listeria* peuvent être identifiées par l'analyse de la séquence de leur gène 16S rDNA mais certaines espèces sont difficiles à différencier par cette méthode. En partenariat avec le pôle d'identification bactérien de l'Institut Pasteur, les différents gènes permettant l'identification moléculaire des bactéries Gram+ ont été testés sur des souches de référence. Le but est de proposer une PCR d'identification alternative au 16S ADNr pour les LABM d'hôpitaux. Les résultats de ces investigations sont en cours d'analyse.

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 de biologie médicale.

Le CNRL n'est pas un laboratoire d'analyse de biologie 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 participe à une étude prospective cas-témoins (MONALISA) dans le cadre du programme hospitalier de recherche clinique (PHRC) 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 : MULTICENTRIC OBSERVATIONAL NATIONAL ANALYSIS OF LISTERIOSIS AND LISTERIA

Les formes cliniques de la listériose restent très mal caractérisées dans leurs aspects cliniques, diagnostiques et thérapeutiques. Seules sont disponibles des séries rétrospectives fondées sur des compilations très hétérogènes de malades. L'évolution des malades est également très mal connue, et aucun facteur pronostique n'a été à ce jour identifié. Un projet d'étude a été financé afin de résoudre ce problème (site : http://www.recherchecliniquepariscentre.fr/wp-content/uploads/2012/01/monalisa_r%C3%A9sum%C3%A9_20090925_LLE.pdf).

2.1.1.4.2 SOUCHES NECESSAIRES A LA VALIDATION DES KITS DE MICROBIOLOGIE

Suite à la publication par la DGAL d'une version modifiée de la Note DGAL/SDSSA/N2008-8009 en août 2010, le CNRL a été sollicité en 2011 par le bureau technique des méthodes d'analyses en microbiologie de la chaîne alimentaire d'Afnor certification pour vérifier et préciser les souches de référence des espèces et sous-espèces ou biovars devant être incluses dans tout schéma de validation de kits diagnostics.

En collaboration avec le LNR, une publication sur la méthodologie de validation des kits microbiologique pour la microbiologie de la chaîne alimentaire a été effectuée : B. Lombard et A. Leclercq. 2011. Validation of innovative food microbiological methods according to the EN ISO 16140 standard. Food Analytical Methods. 4(2): 163-172.

2.1.2 MAINTIEN, DETENTION ET DIFFUSION DE MATERIEL BIOLOGIQUE

2.1.2.1 LES SOUCHES BACTERIENNES

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 DGAI 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 DGAI 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 DGAI 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, gérée sous procédure de management de la qualité (cf. chapitre 1.4.) et très utile dans le cas d'une investigation d'un clone épidémique pour identifier son origine géographique, temporelle ou sa source.

Par ailleurs, le CNRL maintient et met à disposition sur demande motivée, les souches type des espèces de *Listeria* et les souches de référence pour la sérotypie ainsi que les serums de sérotypie non commercialisés.

Les différentes collections sont les suivantes :

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

Le CNRL dispose des souches types des 10 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* subsp. *grayi*, *L. grayi* subsp. *murrayi*, *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 dans un congélateur sous alarme permanente.

En 2011, le CNRL a déposé la souche type de *L. grayi* subsp. *murrayi* à la collection de l'Institut Pasteur pour son utilisation pour la validation de méthodes.

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

Chaque année, la collection du CNRL et du CCOMS s'incrémente de plus de 1.300 souches, parfois beaucoup plus en situation épidémique (10.000 souches annuelles dans les années 1990) et quelle que soit leur origine. 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.

Environ 55.000 souches de cette collection proviennent du CNRL. Ces souches sont conservées en gélose profonde dans des pièces à température contrôlée. Les souches d'origine humaine sont conservées à -80°C en tube de cryo-billes dans un congélateur sous alarme permanente. Cette collection, majoritairement française mais également internationale (CCOMS) comportait environ 108.000 souches à la fin de l'année 2011. Ces souches sont d'origine clinique, environnementale et alimentaire ainsi que vétérinaire ou de recherche. Néanmoins, le CNRL conserve certaines souches isolées entre 1987 et 1992 provenant de la collection du CNRL alors hébergé au CHU de Nantes.

Special *Listeria* Culture Collection (SLCC)

Il s'agit de la collection de *Listeria* 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 léguée au CCOMS des *Listeria* est de contenir des souches anciennes, isolées depuis la première souche de *L. monocytogenes* (1921), de diverses origines géographiques, une majorité de souches ayant été isolées en France et Allemagne. Certaines de ces souches sont actuellement utilisées dans le cadre de projets de recherche concernant notamment l'étude de l'évolution et de la biodiversité 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 ILSI North America

Il s'agit de la collection du Technical Committee on Food Microbiology of ILSI North America contenant 43 isolats dont 25 souches représentent la diversité des *L. monocytogenes* et les autres des souches d'épidémies, et mise à disposition du CCOMS. Ces souches sont utilisables pour évaluer et valider des méthodes d'analyse ou celles de typage moléculaire et réaliser des essais de microbiologie prévisionnelle ou de croissance/survie comme dans les aliments. Ces souches sont conservées à -80°C en tube de cryo-billes dans un congélateur sous alarme permanente.

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'EN ISO 17025 pour des essais de caractérisation des souches et certifiée AFAQ EN ISO 9001 pour son organisation) où le CNRL a déposé depuis 2004 sous contrat 152 souches qui constituent un échantillon représentatif des souches françaises humaines et non humaines du genre *Listeria* de 1981 à nos jours (souches d'épidémies, de travaux de séquençage, de sérovars rares, souches de référence, souches types, etc.) ainsi que les souches de référence de taxonomie et de sérotypie. Des souches du genre *Listeria* et de l'espèce *L. monocytogenes* ayant des propriétés originales sont régulièrement mises en collection. Les informations associées aux souches sont regroupées dans une base de données informatique (logiciel ARPAS). Moyennant une somme couvrant les frais d'envoi et de maintien en collection sous assurance qualité, 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.

2.1.2.2 LES SERUMS

Le CNRL produisait les 13 sérums contre les antigènes somatiques de *Listeria*, et si nécessaire les 5 sérums anti-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 en routine de ces sérums a été arrêtée mais un stock minimum a été maintenu. Aucune commercialisation ou distribution de ces sera n'a été effectuée. Chaque sérum représenterait un coût annuel de production de 800 euros/10 ml et la poursuite de la 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*. Les laboratoires correspondants préfèrent à ce jour envoyer leurs souches à sérotyper que de recevoir les sérums.

2.1.2.3 LES BACTERIOPHAGES

Le CNRL possède la collection de bactériophages de lysotypie du Centre International de Lystopie des *Listeria* (1982-1992 ; Institut Pasteur, Paris). Cette collection présente un regain d'intérêt du fait des nouveaux outils diagnostiques fondés sur l'utilisation des phages, leur utilisation potentielle en thérapeutique et en sécurité microbiologique des denrées alimentaires telles que le fromage.

2.1.2.4 DIFFUSION ET ECHANGE DE MATERIEL BIOLOGIQUE

Le CNRL propose 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. Au cours de la RICAI 2011 section Accréditation des laboratoires, le CNRL a rappelé sa mission de procurer au laboratoire demandeur des souches soit représentatives des souches circulantes sur le territoire soit des souches types pour la validation de méthodes internes ou non par les laboratoires LABM.

→ En 2011, le CNRL a envoyé 79 souches.

→ En 2011, le CNRL a envoyé 4 souches de plan de surveillance ou de contrôle et environ 350 souches d'alertes produits au LNRI (Laboratoire National de référence des *Listeria monocytogenes*) dans le cadre de la convention LNR/CNRL d'échange de souches.

→ En 2011, le CNR a réceptionné 72 souches et ADN de laboratoires étrangers.

2.1.2.5 CONDITIONS DE MISE A DISPOSITION DE CES COLLECTIONS

L'accès aux souches, aux prélèvements biologiques et données associées collectés dans le cadre de l'activité des CNR est conditionné par la mise en place de documents contractuels spécifiques. Ainsi, est exigée pour le transfert du matériel biologique et des données associées, la mise en place *a minima* d'un accord de transfert de matériel biologique (Material Transfer Agreement - MTA) ou d'un accord de collaboration selon la nature des interactions entre les deux parties.

Suivant le statut industriel ou académique du partenaire et la nature de l'accord, cette mise à disposition donnera lieu ou non à une contrepartie financière.

Ces accords ont notamment pour objet d'assurer le transfert de la détention physique du matériel au partenaire. L'unité de recherche désignée CNR, de part la valorisation de son savoir-faire et de son expertise sur le matériel biologique concerné, reste détenteur des prélèvements biologiques et données associées ou propriétaire des droits existants sur les souches et données associées y afférant.

Différents points essentiels sont appréhendés dans ces accords :

- le partenaire s'engage à n'utiliser les souches, les prélèvements biologiques et données associées que dans le cadre d'un programme de recherche défini spécifiquement.
- les résultats issus du programme de recherche devront systématiquement être communiqués par le partenaire au CNR ; le CNR sera également associé ou remercié dans les publications et/ou aux communications.

- le tiers partenaire s'engage à ne pas transférer les souches, les prélèvements biologiques et les données associées à des tiers et à retourner ou détruire le matériel biologique à la fin du programme de recherche.

En termes de valorisation, l'Institut Pasteur s'assure dans certaines circonstances de la copropriété des résultats issus des travaux effectués sur le matériel biologique et veille à ce que la valorisation du savoir-faire et de l'expertise du CNR ayant conservé, traité, trié et analysé le matériel biologique soit garanti au titre de l'accord.

Lorsque le matériel biologique et les données associées sont mis à disposition dans le cadre d'une collaboration scientifique par laquelle les partenaires s'associent de manière plus conséquente à la réalisation du programme de recherche, la valorisation des travaux menés conjointement devra tenir compte des apports respectifs de chacun des partenaires.

Les accords excluent toute garantie relative (i) à la nature appropriée des souches, des prélèvements biologiques et données associées pour une utilisation spécifique et (ii) à la qualité non-infectieuse du matériel biologique.

L'interdiction de l'utilisation du matériel biologique sur l'homme et sur les animaux, le cas échéant, est également stipulée dans l'accord.

Enfin, le CNR n'assume aucune responsabilité quant à l'utilisation du matériel biologique par le partenaire.

2.1.3 TECHNIQUES RECOMMANDEES PAR LE CNRL

2.1.3.1 RECOMMANDATIONS GENERALES

2.1.3.1.1 EN MICROBIOLOGIE CLINIQUE

Concernant les prélèvements cliniques pour la recherche de *L. monocytogenes*, le CNRL recommande de suivre les recommandations du REMIC (Anonyme, 2010b).

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, 2010a) et de l'EUCAST (<http://www.eucast.org/>) 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 antisera dans ce kit. Les autres kits commerciaux n'ont pas été évalués ou soumis à validation par le fournisseur auprès du CNRL.

- *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, trimétoprime-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 2010b, Sérodiagnostic de la listériose, chapitre 37, 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 International des Epizooties téléchargeables à l'adresse :

http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.09.07_LISTERIA_MONO.pdf

2.1.3.1.3 EN MICROBIOLOGIE DES ALIMENTS

Conformément aux règlements européens EC 2073/2005 modifié, le CNRL recommande en France de suivre la norme de référence pour les prélèvements de l'environnement NF ISO

18593 : Microbiologie des aliments - Méthodes horizontales pour les techniques de prélèvement sur des surfaces, 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 auquel participe le CNRL, le CNRL recommande les méthodes alternatives validées selon l'EN ISO 16140 par AFNOR certification et par Microval (Tableaux 2 et 3) disponibles sur les sites respectifs : <http://www.afnor-validation.org/afnor-validation-agroalimentaire/agroalimentaire.html> et <http://www.microval.org/validated-methods-lm.html>. Il est à noter que, pour la validation de ces kits, le CNRL en 2011 a redéfini avec AFNOR certification la liste des souches de référence à tester et les espèces ainsi que les sous-espèces pour pouvoir prétendre à la détection et dénombrement des *Listeria spp.*

Concernant les méthodes commerciales d'identification 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 2012 pour la détection et l'énumération de *Listeria* spp. 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> et <i>Listeria</i> spp.	AES CHEMUNEX
Rapid <i>Listeria</i> spp	Milieux de culture Détection des <i>Listeria</i> spp.	BIO-RAD
Rapid L'Mono (Recherche)	Milieux de culture Détection des <i>Listeria monocytogenes</i> et <i>Listeria</i> spp.	BIO-RAD
Compass <i>Listeria</i> Agar	Milieux de culture Détection des <i>Listeria monocytogenes</i> et <i>Listeria</i> spp.	SOLABIA S.A.S
Gélose chromID™ Ottaviani Agosti (Détection)	Milieux de culture Détection des <i>Listeria monocytogenes</i> et <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
RayAL <i>Listeria</i>	Tests immuno-enzymatiques Détection des <i>Listeria</i> spp.	RAYAL
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
GeneDisc <i>Listeria</i> spp	PCR - Détection des <i>Listeria</i> spp.	Pall GeneDisc Technologies

Tableau 3 : Liste des méthodes alternatives validées AFNOR certification en mars 2012 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> et <i>Listeria spp</i>	AES Chemunex
ALOA Count™	Milieux de culture Dénombrement des <i>Listeria monocytogenes</i>	AES Chemunex
Gélose chromID™ Lmono	Milieux de culture Détection des <i>Listeria monocytogenes</i>	BIOMERIEUX
Gélose chromID™ Ottaviani Agosti (détection)	Milieux de culture Détection des <i>Listeria monocytogenes</i>	BIOMERIEUX
Gélose chromID™ Ottaviani Agosti (dénombrement)	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

Tableau 3 (suite)

NOM COMMERCIAL	TYPE DE METHODE	PRODUCTEUR
Compass <i>Listeria</i> Agar	Milieux de culture Détection des <i>Listeria monocytogenes</i>	SOLABIA S.A.S
Compass <i>Listeria</i> Agar dénombrement	Milieux de culture Dénombrement des <i>Listeria monocytogenes</i>	SOLABIA S.A.S
Transia Plate <i>Listeria monocytogenes</i>	Tests immuno-enzymatiques Détection des <i>Listeria monocytogenes</i>	BioControl Systems
Vidas <i>Listeria monocytogenes</i> 2 (avec étape d'enrichissement à 30°C)	Tests immuno-enzymatiques Détection des <i>Listeria monocytogenes</i>	BIOMERIEUX
Vidas <i>Listeria monocytogenes</i> 2 (avec étape d'enrichissement à 37°C)	Tests immuno-enzymatiques Détection des <i>Listeria monocytogenes</i>	BIOMERIEUX
Vidas <i>Listeria</i> DUO	Tests immuno-enzymatiques Détection des <i>Listeria monocytogenes</i> et <i>Listeria</i> spp	BIOMERIEUX
Vidas <i>Listeria monocytogenes</i> Xpress (VIDAS LMX)	Tests immuno-enzymatiques Détection des <i>Listeria monocytogenes</i>	BIOMERIEUX
BAX® <i>Listeria</i> mono 24E	PCR Détection des <i>Listeria monocytogenes</i>	DuPont Qualicon
IQ Check <i>Listeria monocytogenes</i>	PCR Détection des <i>Listeria monocytogenes</i>	BIO-RAD
ADIAFOOD <i>Listeria monocytogenes</i>	PCR Détection des <i>Listeria monocytogenes</i>	AES CHEMUNEX
GenDisc <i>Listeria monocytogenes</i>	PCR Détection des <i>Listeria monocytogenes</i>	Pall GeneDisc Technologies
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'ÉVALUATION ET D'AMÉLIORATION DES TECHNIQUES, REACTIFS ET TROUSSES

Ces travaux d'amélioration des techniques sont décrits dans les chapitres 2.1.1.4.

2.1.5 TECHNIQUES TRANSFERÉES VERS D'AUTRES LABORATOIRES

Dans le cadre d'un projet transversal de recherche, le CNRL a réalisé un transfert de technologie vers le LNR concernant la MLST en 2011.

2.1.6 GESTION, PROTECTION ET SAUVEGARDE DE LA BASE DE DONNÉES DU CNRL

L'ensemble des données épidémio-clinico-microbiologiques collectées pour chaque souche est rassemblé dans le Système Informatique du Laboratoire (SIL) du CNRL. Ce SIL est en conformité avec les exigences réglementaires et normatives actuelles et une veille sur ces derniers points assure son actualisation. Il s'agit de la conformité aux exigences de la norme NF EN ISO 15189 d'accréditation des laboratoires d'analyses de biologie médicale qui s'applique au CNRL et de l'ASIP Santé (Agence des Systèmes d'Information Partagés de Santé). L'ASIP Santé gouverne aujourd'hui tout le paysage des systèmes d'informations en santé et impose des règles en matière de sécurité, de confidentialité et d'interopérabilité qui vont avoir à courts termes des conséquences non négligeables sur les outils informatiques utilisés par les CNR. On peut citer plusieurs points : (1) Agrément pour l'hébergement de données médicales à caractère personnel. La société EpiConcept a fait un dépôt de candidature pour obtenir cet agrément et a de fait acquis une expertise réelle sur ce sujet (sécurité, juridique, fonctionnel), (2) accès aux informations via une authentification forte des utilisateurs (carte CPS ou CPA) et (3) respect d'un cadre d'interopérabilité pour les échanges de données médicales avec des tiers (InVS par exemple).

Ce SIL est protégé par 3 niveaux de mots de passe individuels et se situe sur un serveur interne protégé dédié de l'Institut Pasteur. Une journalisation des connexions est effectuée. Un verrouillage automatique du poste informatique intervient après 10 minutes d'inactivité. Les données sont échangées en réseau sous forme chiffrée. Les données sont sauvegardées quotidiennement de façon centralisée et automatisée. Depuis 2003, le fonctionnement du CNRL est conforme au GBUI (Guide de Bonne Utilisation de l'Informatique). L'ensemble des prestataires de service internes et externes ont signé des clauses de confidentialité et respectent les réglementations pour la gestion des matériels ou données de santé publique.

Gestion des données clinico-biologiques : Logiciel LAGON® (EpiConcept)

Le logiciel LAGON® (EpiConcept) est utilisé depuis le 1er janvier 2005. Outre la gestion en temps réel des échantillons (suivi administratif, enregistrements des résultats techniques, etc.), le logiciel LAGON® permet l'anonymisation des données, leur archivage ainsi qu'une meilleure traçabilité. Le logiciel LAGON® a été optimisé depuis 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 6.6 (Applied Maths, Belgique) permettant l'analyse et le stockage des profils de macrorestriction.

Gestion des données de caractérisation/typage des souches : Logiciel Bionumerics 6.6® (Applied Maths)

Le CNRL possède une base de données des profils de macrorestriction des souches réceptionnées au CNRL depuis 2005 qui comporte outre les 11.000 profils de macrorestriction, le numéro de la souche, son origine humaine-alimentaire-autre par une lettre, le numéro d'alerte produit associé, son pays de provenance, sa sensibilité aux antibiotiques, des remarques techniques 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. Le CNRL est en constante Recherche & Développement avec la firme afin d'améliorer la qualité de sa base et celle de la surveillance (critères d'inclusion des profils par une note qualité, etc.).

↳ En coopération avec le service de Coordination des Centres de Référence de l'Institut Pasteur, le CNRL a mis à jour sa déclaration de cette base de données de LAGON auprès de la Commission Nationale Informatique et Libertés (CNIL) : Déclaration Normale, Numéro de déclaration 1474696v0, Récépissé reçu de la CNIL en date du 19 janvier 2011.

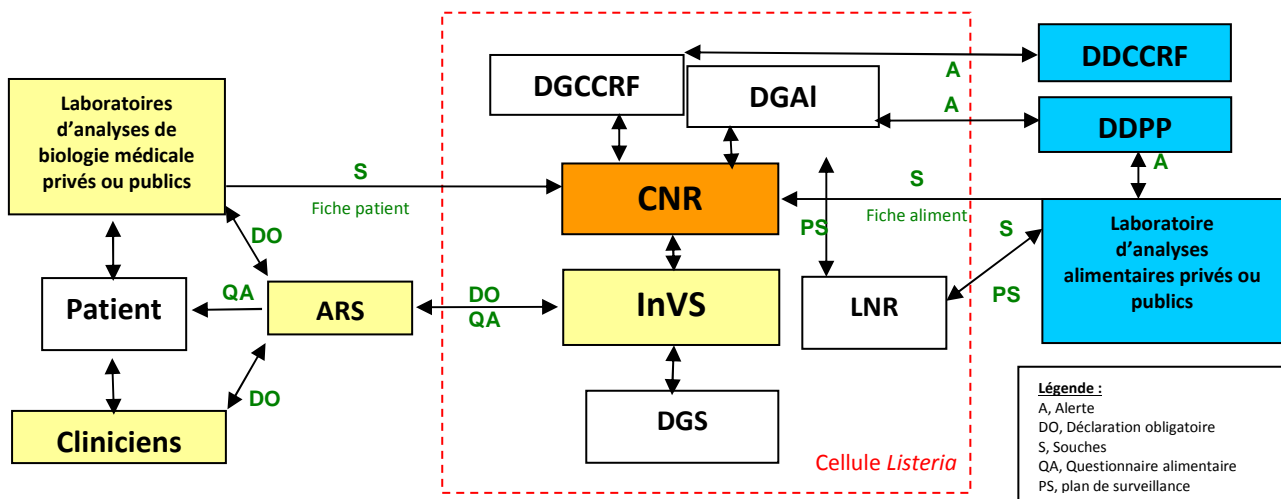
2.2 SURVEILLANCE DE LA LISTERIOSE HUMAINE EN FRANCE

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. En 2007, l'ANSES et le LNR ont incorporé la cellule *Listeria*.

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 ainsi que le LNR 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 ; DDPP : Directions Départementales de la Protection des Populations ; DDCCRF : Direction Départementales de la Consommation et de la Répression des Fraudes ; DGCCRF : Direction Générale de la Consommation et de la Répression des Fraudes ; ARS : Agence Régionale de Santé ; DGS : Direction Générale de la Santé.

↳ Suite à la participation du Laboratoire National de Référence des *Listeria monocytogenes* situé à l'ANSES-LSA (Maisons-Alfort) à la Cellule *Listeria*, une clarification du rôle de chaque intervenant était nécessaire au sein de la cellule *Listeria*, ce qui a été fait au cours d'une réunion en Avril 2008 entre l'InVS, la DGAI, le LNRI et le CNRL. En effet, il est indispensable que les différents laboratoires correspondants disposent d'une procédure précise d'acheminement des souches qui permet *in fine* une surveillance optimale de la listériose. Ceci nécessite une vigilance réciproque pour l'échange rapide de souches entrant dans le cadre de la surveillance nationale. En 2011, les erreurs de destination CNRL ou LNRI ont été très faibles (3 seulement).

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 2011, 315 souches d'origine humaine ont été reçues, concernant 283 cas diagnostiqués par des laboratoires de France métropolitaine (plus 1 cas retenu par l'InVS sans souche associée) et 6 cas diagnostiqués par des laboratoires des DROM-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 2011 et inclut nécessairement des souches reçues au CNRL avant mi-février 2012 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 (sérovar, groupe PCR et profils de macrorestriction d'ADN) des souches isolées de cas humains a pour but de détecter rapidement une augmentation du nombre de cas provoqués par une souche unique. Lors de la surveillance, le CNRL signale par courrier électronique aux autres membres de la Cellule *Listeria* les cas groupés ou tout autre phénomène considéré comme inhabituel ou anormal. Les critères de signalement sont définis dans un document rédigé et mis à jour par la Cellule *Listeria*.

Ainsi, un épisode de cas 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. 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 *Apal* et *Ascl* 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 2011, 9 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 DDPP dans certains établissements de fabrication ciblés par l'enquête, recherche de l'origine des souches épidémiques alimentaires détectées par le CNRL, enquêtes par les DDPP 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.

↳ En 2011, deux situations ont requis la réunion téléphonique de la Cellule *Listeria* mais la phase d'Alerte n'a pas été déclenchée (cf. chapitre 3.3.3.).

2.2.5 SURVEILLANCE DE LA RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES

Depuis 2006, le CNRL a modifié sa méthodologie pour la surveillance de la résistance aux antibiotiques. La détermination de la sensibilité de toutes les souches d'origine humaine est effectuée en utilisant la technique de dilution en milieu gélosé selon les recommandations de EUCAST. 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 β -lactamines déjà observé pour d'autres bactéries à gram positif;
- le contexte d'évaluer la fréquence globale de la résistance parmi les souches d'origine humaine, environnementale ou alimentaire et des tendances évolutives de la sensibilité.

Les résultats de la surveillance des souches d'origine humaine isolées en 2011 sont présentés dans le chapitre 3.1.5.

2.2.6 DETECTION ET ANALYSE DES INFECTIONS NOSOCOMIALES

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

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

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

↳ En 2011, ce mode de transmission a été suspecté à 5 reprises. Cependant, un seul cas d'infection nosocomiale a pu être formellement prouvé (cf. chapitre 3.3.1.).

2.3 CONTRIBUTION OU COLLABORATION AUX INSTANCES ET SYSTEMES DE SURVEILLANCE NATIONAUX, EUROPEENS ET INTERNATIONAUX

La surveillance microbiologique et épidémiologique de la listériose ne peut plus être réalisée de façon isolée mais avec des collaborations, et 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 DROM-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 InVS

Le CNRL est en lien pluri-hebdomadaire avec l'InVS pour la surveillance nationale et journalière dans les suivis de dossiers de souches humaines ou d'investigations. En collaboration avec l'InVS et l'ECDC, le CNRL est candidat pour accueillir des étudiants épidémiologistes des programmes PROFET, EPIET et EUPHEM (European Public Health Microbiology Training Programm) soucieux de se former à la surveillance microbiologique et le lien avec la surveillance épidémiologique ainsi que d'effectuer du data mining.

2.3.2 ANSES ET LNR *LISTERIA MONOCYTOGENES*

Dans le cadre d'un accord validé par la cellule *Listeria*, un échange de souches d'alertes produits et de profils entre le CNRL et le LNR a été formalisé et est opérationnel depuis 2008. L'échange des profils permet de tendre vers l'exhaustivité des souches dans la surveillance hebdomadaire nationale. Depuis 2010, le LNR et le CNRL investiguent la caractérisation de la contamination d'un produit à risque : le beurre. Enfin, un projet transversal de recherche Institut Pasteur/ANSES impliquant le CNRL, la Plate forme de santé publique PF8-IP et le LNR a été financé en 2010 et se termine en 2012.

Le CNRL en la personne d'A. Leclercq a été nommé en 2011 pour la rédaction de la fiche ANSES

sur le danger « *Listeria monocytogenes* » pour le grand public et les exploitants agro-alimentaires, en collaboration avec E. Pierron (IFIP) ainsi que R. Ruscassié (ANSES), qui a été relue par le CES Microbiologie de l'ANSES.

2.3.3 DGS – DGAL – DGCCRF

Le CNRL a participé à des réunions téléphoniques coordonnées par la DGS dans le cadre de gestion d'alertes ou de cas groupés.

Le CNR, par sa mission de surveillance microbiologique hebdomadaire pour la cellule *Listeria* est en lien constant avec la DGAL et la DGCCRF qui, outre la gestion des alertes, lui demandent des avis techniques tant au niveau central que décentralisé, et une participation éventuelle à l'établissement des plans de surveillance.

Suite à la demande en 2007 du CNRL, les autres membres (DGAL, DGCCRF, InVS) de la Cellule *Listeria* communiquent au CNRL/CCOMS les informations du réseau RASFF de l'Union européenne. Le CNRL a été sollicité pour récupérer les souches de ces alertes et les inclure dans la surveillance nationale. 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 international.

2.3.4 LABORATOIRE DE REFERENCE DES *LISTERIA MONOCYTOGENES* DE L'UNION EUROPEENNE

Le laboratoire communautaire de référence (EU-RL) des *Listeria monocytogenes* a été créé fin 2006 par la Commission Européenne. Il se situe au laboratoire ANSES-LSA de Maisons-Alfort qui est également Laboratoire National de Référence des *Listeria monocytogenes*. Ce laboratoire s'intéresse à l'espèce *monocytogenes* du genre *Listeria* et aux souches alimentaires ainsi que vétérinaires reliées au contrôle des zoonoses. Il a également pour mission l'étude de l'antibiorésistance des souches zoonotiques et participe 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*. Il est à noter que les bases de données PFGE entre le CNRL et l'EU-RL sont complètement compatibles et peuvent échanger des données si nécessaire.

En 2007, le CCOMS/CNRL a sollicité le LNR/EU-RL afin d'évaluer 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. L'EU-RL/LNR a envoyé par la suite une demande officielle aux CCOMS/CNRL des *Listeria* pour définir l'impact en termes de santé publique des souches de *L. monocytogenes* non hémolytiques. Le CNRL a finalisé fin 2011 l'étude des causes de ce caractère non hémolytique et son impact sur la virulence de ces souches. Un article est en cours de rédaction. En 2011, le CNRL et le CCOMS ont présenté un exposé lors de la journée annuelle des LNR et des LCR en présence de la Commission Européenne DG SANCO. Il s'agissait de présenter les avancées des méthodes de typage moléculaire dont la MLST et la MLVA.

2.3.5 EUROPEAN CENTER FOR DISEASES CONTROL: ECDC

Le CNRL a participé ou contribué activement en 2011:

- aux groupes de travail *Listeria* du réseau européen des maladies d'origine hydrique et alimentaire (FWD) de l'ECDC ;
- au meeting «Expert Consultation : Breakthroughs in molecular epidemiology of human pathogens : How to translate into public health practice », Stockholm, 22-23 Novembre 2011;
- en lien avec l'InVS à la notification de données françaises à la base ECDC TESSY (European Surveillance System) permettant la surveillance des maladies infectieuses au niveau européen et participe en relation avec l'InVS aux investigations de cas groupés ou épidémies européennes signalées via cette base ECDC EPIS (Epidemic Intelligence Information System) comme dans le cas de l'épidémie belge (Cf. chapitre 3.3.7.) ;
- à l'exercice européen EFSA-ECDC et au projet ELITE (European *Listeria* Typing Exercise) sur la contamination des aliments prêts à consommer et les cas humains sur la période 2010-début 2011 par l'envoi de souches et le transfert de leurs caractéristiques microbiologiques.
- à la révision du rapport « Report on zoonoses and zoonotic agents and foodborne outbreaks 2010 » de l'EFSA pour la section *Listeria* ainsi que de l'étude « Survey of laboratory capacities of national reference level laboratories (NRLs) for food and waterborne diseases in EU/EEa countries » pour la section *Listeria*, et sur les documents « Surveillance of communicable disease in Europe: Concept to integrate molecular typing data into EU surveillance » ;
- au programme EUPHEM avec une visite de site de l'Institut Pasteur le 17 Juin 2011 d'A. JASIR et A. BOSMAN de la section Public Health Training ;
- à la rédaction d'une note d'expertise sur le remplacement du sérotypage classique par le génosérogroupe PCR et la nécessité d'inclure ces données dans la base TESSY.

Dans le cadre du 6^{ème} PCRD de l'Union Européenne (DG-Recherche), notre laboratoire a été choisi pour coordonner un programme de surveillance européenne des souches d'origine humaine et d'origine alimentaire de *L. monocytogenes*. Ce programme de surveillance, appelé PulseNet Europe (<http://www.pulsenet-europe.org>), concerne également deux autres pathogènes des aliments : *Escherichia coli* VTEC et *Salmonella*. Son management a été transféré en 2007 à l'ECDC.

Le CNRL et le COMS des *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.

Le CNRL a proposé à l'ECDC de réactiver Pulsenet Europe et de le conforter par la réalisation du projet Listernet d'un réseau de surveillance de la listériose en Europe. En outre, l'étude sur la contamination européenne par *L. monocytogenes* des denrées prêtes à être consommées lancée en 2010 par la 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 2011.

2.3.6 AGENCE DE LA SANTE PUBLIQUE DU CANADA

En Octobre 2011, le CNRL a reçu M.W. Gilmour, Directeur du Programme des maladies entériques du Laboratoire National de Microbiologie de l'Agence de la Santé publique du Canada qui souhaitait discuter des collaborations possibles en termes de recherche et également de comprendre notre système de surveillance français ainsi que le fonctionnement du CNRL.

2.3.7 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'Etat 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 2011, le CNRL a suivi 13 alertes RASFF surtout sur des produits de la mer fumé (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 international. 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.

2.3.8 CENTRE COLLABORATEUR OMS (CCOMS)

Le Groupe Microorganismes et barrières de l'hôte est également Centre Collaborateur de l'OMS des *Listeria* (Site web : <http://www.pasteur.fr/ip/easysite/pasteur/fr/sante/centres-nationaux-de-referance-et-centres-collaborateurs-de-l-oms/cnr-et-ccoms/cnr-des-Listeria/identite-et-coordonnees>).

Son mandat de CCOMS des *Listeria* a été renouvelé le 30 Novembre 2011 pour une période de 4 ans avec les termes de référence (missions) suivants :

1. Contribuer aux efforts de l'OMS dans la surveillance internationale de la listériose ;
2. Travailler avec l'OMS sur l'épidémiologie de la listériose ;
3. Contribuer à la collecte de données pour les travaux OMS de l'analyse du risque ;
4. Contribuer avec l'OMS dans le contrôle de la résistance des *Listeria* aux agents antimicrobiens ;
5. Assister l'OMS dans le soutien et l'aide à la prévention de la listériose.

Le CNRL participe à la surveillance internationale de la listériose, à la collecte de données pour l'analyse des risques réalisée par l'OMS, à la surveillance de la résistance aux agents antimicrobiens des *Listeria*, et à la formation des personnels qui le contactent. Le CCOMS a ainsi formé de nombreux stagiaires désireux de s'initier aux techniques de surveillance et de typage de *Lm*. Il répond aux sollicitations de l'OMS et apporte s'il le peut une assistance technique en cas de crise sanitaire. Le large panel de souches qui lui sont envoyées par ses différents correspondants internationaux lui permet de conduire des études sur la biodiversité de *Listeria* à large échelle.

En 2011, à la demande de l'OMS, le CNRL et le CCOMS ont réalisé une courte note de synthèse sur le danger *Listeria monocytogenes* dans les cantaloupes ou melons pour l'analyse de risque sur le Melon du JEMRA (Consultations mixtes FAO/OMS d'experts de l'évaluation des risques biologiques), juste avant l'épidémie aux USA incriminant ce produit. Le CNRL a fait état de ces données au CES Microbiologie de l'ANSES lors de cet épisode épidémique et a rappelé qu'un épisode français de melons contaminés en surface en 2009 avait eu lieu, sans que des cas lui aient été reliés.

3 ACTIVITES DE SURVEILLANCE

3.1 DONNEES DE LA SURVEILLANCE MICROBIOLOGIQUE DE LA LISTERIOSE HUMAINE

3.1.1 CAS DE LISTERIOSE EN FRANCE

3.1.1.1 DEFINITION DE CAS

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

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

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

Le système de surveillance de la listériose du CNRL est basé sur l'étude des souches adressées volontairement par les biologistes. Il s'agit donc d'un système passif, non-exhaustif. La présente étude concerne tous les cas pour lesquels le prélèvement positif à *L. monocytogenes* a été réalisé en 2011 et la souche caractérisée par le CNRL. Ceci inclut donc les souches reçues au cours du premier trimestre 2012 compte tenu des retards dans l'envoi des souches au CNRL.

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

En 2011, un cas a été retenu par l'InVS alors que le CNRL n'a pas reçu la souche *L. monocytogenes* associée. 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 2011, le CNRL a reçu 315 souches (2010 : 343 souches) représentant en fait 288 cas (2010 : 307 cas) de suspicion de listériose. La différence observée s'explique par l'existence de doublons / triplicats (2011 : 27 souches) de souches par patient, non pris en compte dans l'analyse finale.

Pour 5 cas (1,5 % contre 1,3% en 2010), le CNRL n'a pas confirmé le diagnostic de listériose puisqu'il s'agissait de souches n'appartenant pas au genre *Listeria* comme le genre *Legionella* ou *Lactobacillus*.

En 2011, les échantillons biologiques (LCR, sérum) adressés au CNRL dans le cadre de suspicion de listériose, dont le diagnostic n'entre pas dans le cahier des charges du CNRL, ont été transférés au service de microbiologie de l'hôpital Necker-Enfants Malades. Cependant, 4 selles et 1 prélèvement vaginal avec suspicion de présence de *L. monocytogenes* ont été expertisés par le CNRL durant une investigation d'une toxi-infection alimentaire dans une famille ainsi que d'une forme neuroméningée chez un jeune enfant. Deux selles se sont révélées positives à *L. monocytogenes* dont une souche similaire en caractéristiques microbiologiques à celle du LCR du jeune enfant. En 2011, aucun autre échantillon biologique n'a été expertisé.

Au total, en 2011, le CNRL retient donc 283 cas de listériose (2010 : 303 cas) au jour du traitement statistique de ce rapport (Elimination des souches confirmées « Non *Listeria* » ou des tubes cassés à réception et, dont, d'après les cas recensés par l'InVS de la déclaration obligatoire, 1 cas de différence sans souche associée). Ces cas étaient répartis en 277 cas en provenance de France métropolitaine et 6 cas en provenance des Départements et Territoire d'Outre-mer (DROM-TOM) [Guyane (1), Réunion (4), Guadeloupe (1)]. Les 6 cas des DROM-TOM sont analysés dans le chapitre 3.1.4.

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 ARS 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. Depuis 2008, 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 ARS

pour la récupération des souches dans un objectif épidémiologique. Il a été complété par un système de relance des correspondants par l'InVS et le CNRL.

La complémentarité des 2 systèmes (CNRL/InVS) en 2011 a permis **un taux d'exhaustivité de 100%** (2010 : 97%) pour la réception des souches, par rapport à l'ensemble des cas recensés par les 2 systèmes (Figure 5). La relance des biologistes par l'InVS et le CNRL a permis de récupérer des souches de 2011 dont la plus récente a été reçue en Mars 2011. La non-récupération de souches par le CNRL résulte de souches non gardées ou non envoyées par les LABM ou dont le diagnostic de listériose a été réalisé par PCR ou sérologie.

Laboratoires expéditeurs

Parmi les 288 souches qui ont été envoyées pour suspicion de listériose en 2011, 247 (86 % ; 2010 : 268) proviennent de laboratoires hospitaliers et 41 (14 % ; 2010 : 39) de laboratoires privés.

- Le délai moyen entre la date du prélèvement ayant abouti à l'isolement de la souche et la réception de cette souche au CNRL a été de 10 jours (2010 : 10 jours ; moyenne 2006 à 2010 : 11 jours [compris entre 1 et 103 jours] (Figure 3). La réduction de ce délai est l'un des objectifs majeurs de notre système qualité et du CNRL.

Ce délai qui reste élevé entre isolement de la souche et sa réception au CNRL est lié aux difficultés du transport des souches ou des produits biologiques vers le CNR. Pour éviter son allongement, le réseau CNRL-InVS-ARS effectue les relances nécessaires de façon coordonnée pour l'envoi des souches par nos correspondants. 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 de biologie médicale français.

- Le délai moyen entre réception de la souche au CNRL et envoi du rapport d'essai (contenant les résultats d'identification biochimique et la détermination du sérovar ou du groupe PCR) a été de 6,5 jours (2010 : 8 jours ; moyenne 2006 à 2010 : 9 jours) [compris entre 1 et 83 jours (Figure 4)]. La réduction de ce délai est également l'un des objectifs majeurs de notre système qualité et du CNRL. 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). Pour 95% des souches en 2011 (2010 : 95% ; moyenne 2006-2010 : 91%), 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 la souche envoyée, à des difficultés dans la caractérisation de certaines souches, au calendrier des

jours ouvrés ou à une nouvelle demande de caractériser les souches non *Listeria* pour confirmation définitive.

↳ En cas d'urgence ou de demandes de la Cellule *Listeria*, le délai moyen en 2011 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 4 fois en 2011 à la demande de l'InVS dont deux astreintes de week-end. Ces analyses ont été 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 fondée 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.

Figure 3 : Distribution des souches d'origine humaine isolées en 2011 selon le délai entre le prélèvement et la réception au CNRL (en rouge, la médiane).

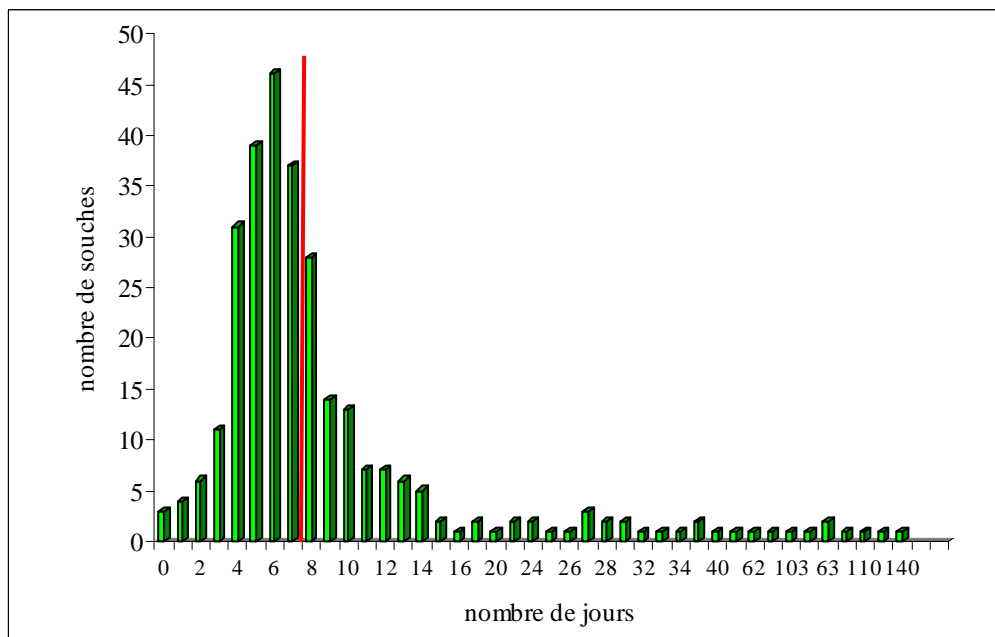
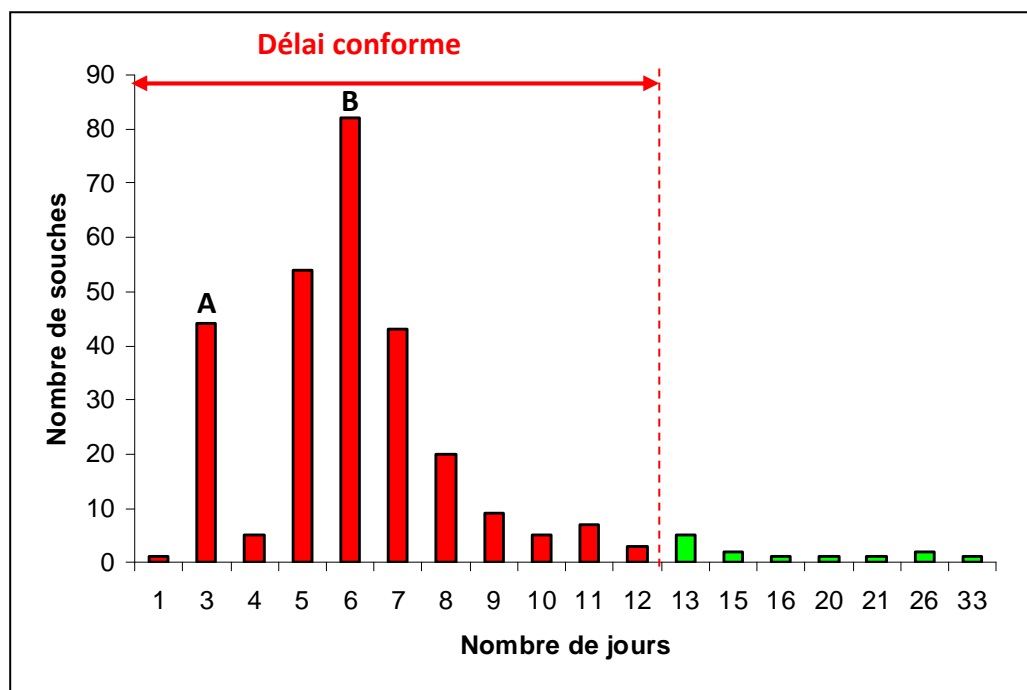


Figure 4 : Distribution des souches isolées en 2011 selon le délai entre la réception de la souche au CNRL et l'envoi du rapport d'essai. En rouge, le délai conforme aux procédures du CNRL (A, pic des rapports d'analyses sur l'identification et le sérotype PCR ; B, pic des rapports d'analyses identification, sérotype PCR et PFGE Ascl/Apal).



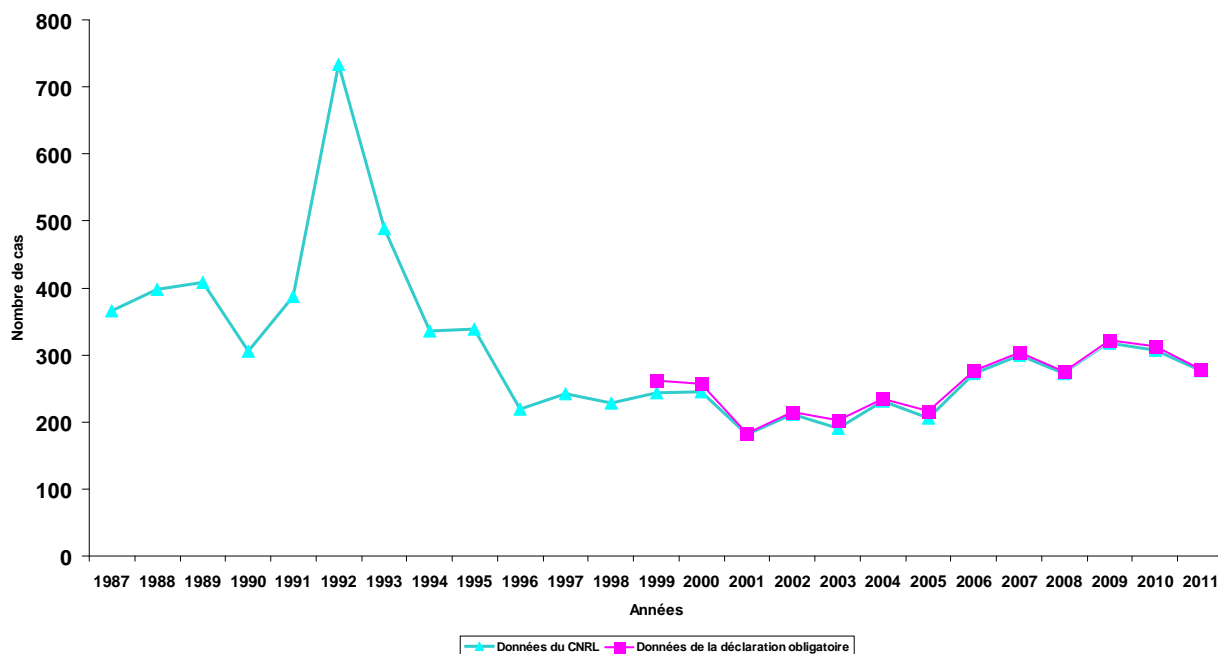
3.1.3 CAS DE LISTERIOSE EN FRANCE METROPOLITAINE

Le nombre de cas recensés en 2011 par le CNRL provenant de la France métropolitaine est de **277 (2010 : 303 cas)**. Après une augmentation en 2006, observée également dans de nombreux pays européens, le nombre de cas de listériose diagnostiqués entre 2007 et 2011 semble stable (Figures 5 et 6) comme en France. Notons qu'aucun épisode épidémique n'a été détecté, la dernière épidémie ayant été observée en 2003. Les nombres de cas recensés par le CNRL entre 2006 et 2011 sont les plus élevés depuis 1995.

En 2011, le taux d'incidence moyen des cas de listériose sporadiques était de 4,4 cas par million d'habitants (2006 à 2010 : 4,6 à 5 cas par million d'habitants ; 4,7 en 2010) qui est le plus bas depuis l'augmentation de 2006.

Le nombre de souches associées à un signalement en 2011 est de 50 (18% des souches ; 2010 : 77 (26%)). Le nombre de signalements de 9 en 2011 (2009 et 2010 : 11) est le même qu'en 2008 et semble stable.

Figure 5. Nombre de cas de France métropolitaine recensés par le CNRL et par la déclaration obligatoire (Source : InVS) depuis 1987



3.1.3.1 DISTRIBUTION TEMPORELLE DES CAS

La distribution mensuelle et trimestrielle des cas sporadiques est représentée pour l'année 2011 dans les Figures 7 et 8.

En 2011, le plus grand nombre de cas a été observé comme entre 2006 à 2010 durant le troisième trimestre bien que ceci soit moins marqué en 2011 par rapport au second semestre.

En 2011, les mois où l'incidence fut la plus forte sont Janvier, Mai et Juillet. Le mois de Janvier était aussi marqué en 2009. Ainsi, la distribution temporelle des cas, et notamment des cas groupés, est variable d'une année à l'autre. Cependant, depuis 2006, une augmentation des cas est observée pendant le trimestre d'été avec un pic en Juillet-Août. Il n'existe pas de véritable variation saisonnière comme pour d'autres microorganismes entéropathogènes. Comme les données européennes le signalent, il existe cependant un certain degré de saisonnalité avec un pic relatif au second semestre.

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

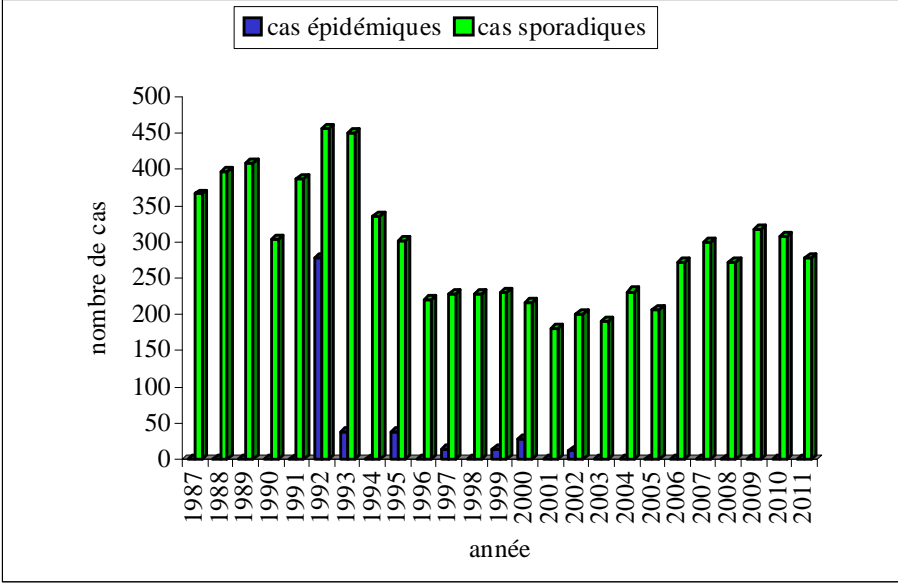


Figure 7 : Distribution mensuelle des cas sporadiques de listériose en France métropolitaine en 2011 (en rouge, les mois avec les plus grands nombres de cas).

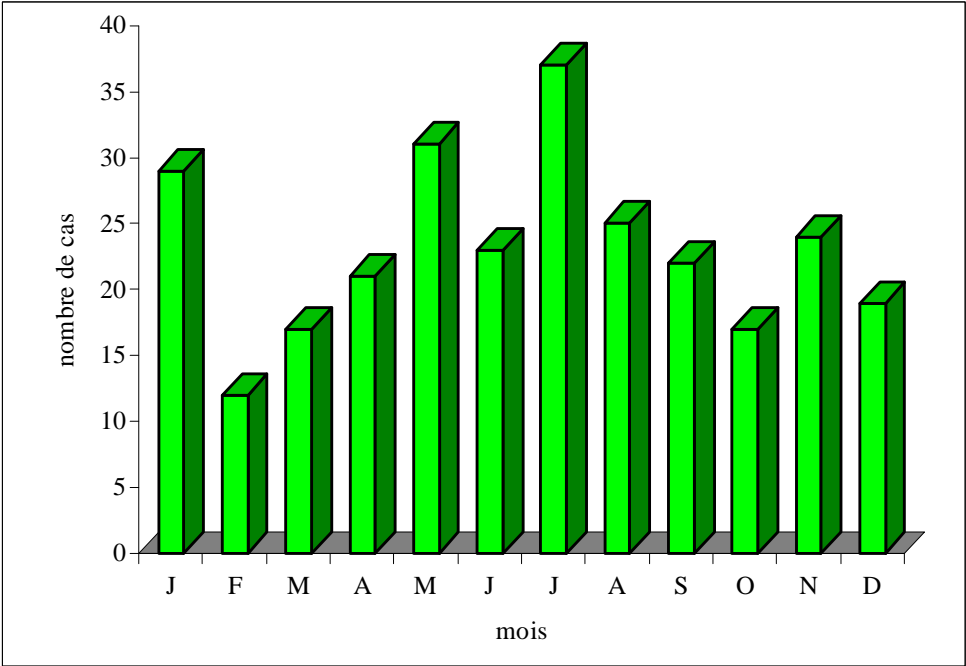


Figure 8 : Distribution trimestrielle des cas sporadiques de listériose en France métropolitaine en 2011 (en rouge, le trimestre majoritaire).

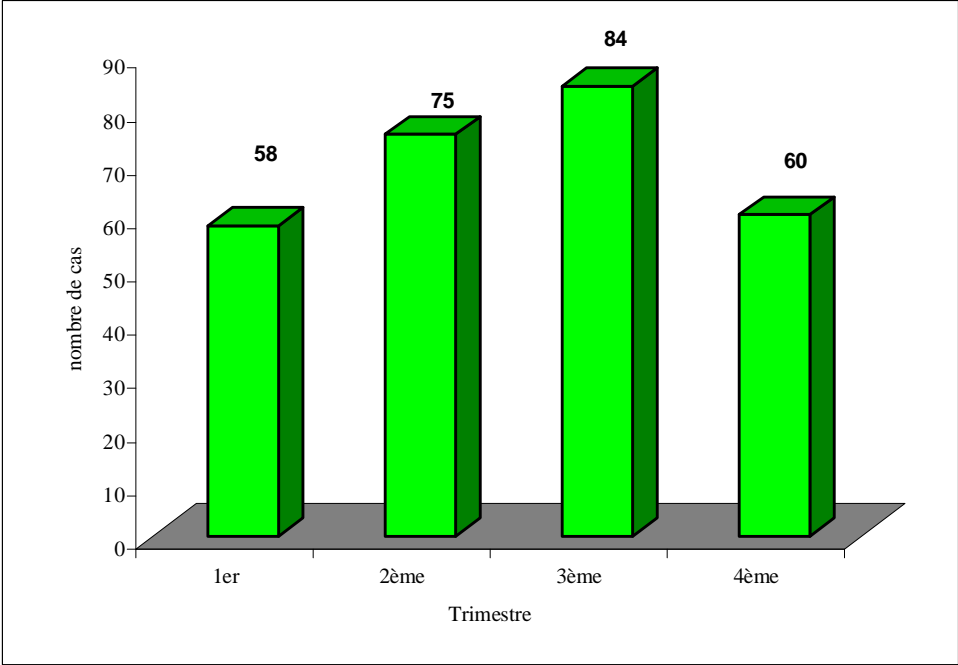
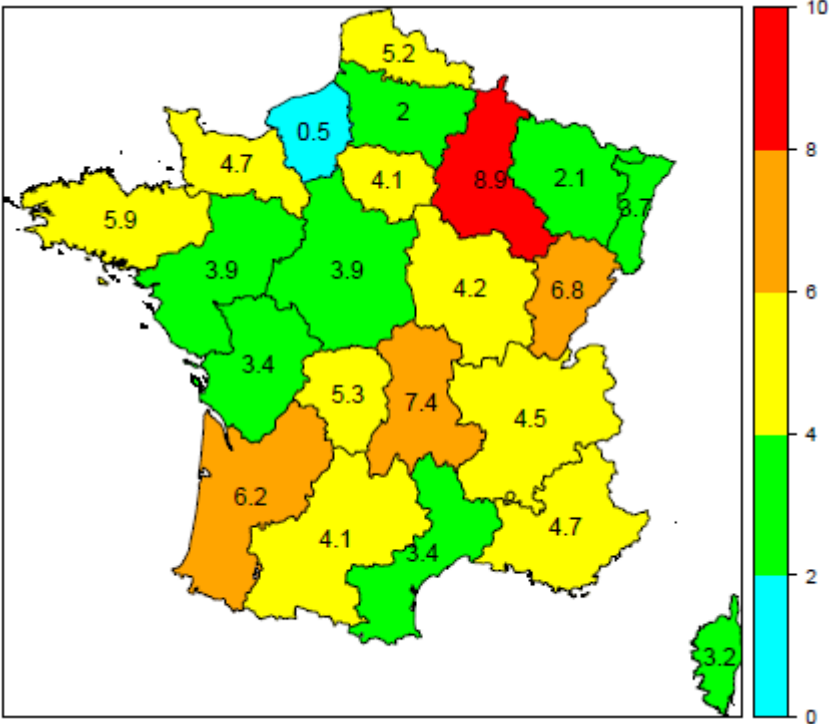


Figure 9 : Incidences régionales globales des cas sporadiques de listériose de 2011 (Echelle en cas par 100.000 habitants).



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 100.000 habitants et sont calculés à partir des chiffres de population évalués par l'INSEE.

Par région (Figure 9)

- Les régions caractérisées par les incidences les plus élevées sont la région Champagne-Ardennes (9/10⁶), l'Auvergne (7/10⁶), Franche-Comté (7/10⁶) et l'Aquitaine (6/10⁶). L'Aquitaine reste en incidence élevée depuis 2009 mais l'incidence élevée en Champagne Ardennes n'avait pas été constatée.

- La région caractérisée par l'incidence la plus basse est la Haute-Normandie (0,5/10⁶). Ceci confirme qu'aucune région n'est caractérisée par une incidence très basse d'une année à l'autre depuis 2006.

- Les régions caractérisées par le plus grand nombre de cas, en valeur absolue, sont Ile-de-France (49) et Rhône-Alpes (28), comme depuis 2007. Les régions caractérisées par les plus faibles nombres de cas, en valeur absolue, sont la Corse (1) et la Haute-Normandie (1).

Par département

- Les départements caractérisés par les incidences les plus élevées sont le Territoire de Belfort (21/10⁶) et le Finistère (14/10⁶) mais plus la Lozère comme précédemment.

- Les départements caractérisés par les incidences les plus basses sont la Seine-Maritime (0,8/10⁶) et le Haut-Rhin (1,4/10⁶) et 21 départements pour lesquels l'incidence est nulle (04-09-11-19-20-23-27-32-39-45-46-48-55-58-60-66-72-79-82-89-2A).

Les départements caractérisés par les plus grands nombres de cas, en valeur absolue, est le Nord (13) et le Finistère (12) mais plus Paris (8).

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 2011 ne sont pas forcément les mêmes que ceux qui étaient épargnés en 2010. De même, les départements pour lesquels l'incidence en 2011 était élevée ne sont pas ceux constatés en 2011.

Cependant, on observe en 2011 comme en 2010, une nette distinction en termes d'incidence entre le Nord et le Sud de la France métropolitaine. Les plus fortes incidences sont en général

observées dans les régions et départements du Sud et dans le Centre de la France sauf cette année la forte incidence en Champagne-Ardennes.

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	2010	2011
Alsace	7	8	12	12	7	8	7
Aquitaine	13	16	32	20	19	20	20
Auvergne	1	6	8	5	8	5	10
Basse-Normandie	6	2	10	5	7	9	7
Bourgogne	5	9	7	7	10	10	7
Bretagne	13	16	15	14	15	20	19
Centre	7	11	8	7	16	13	10
Champagne-Ardenne	3	7	3	7	7	5	12
Corse	2	4	3	0	0	1	1
Franche-Comté	4	2	1	1	6	5	8
Haute-Normandie	5	7	4	6	10	9	1
Ile-de-France	36	42	63	44	58	62	49
Languedoc-Roussillon	7	10	7	14	17	13	9
Limousin	1	2	6	2	4	6	4
Lorraine	11	7	2	8	10	10	5
Midi-Pyrénées	18	25	17	17	12	8	12
Nord-Pas-de-Calais	15	11	21	12	15	17	21
Pays de la Loire	9	11	4	11	9	11	14
Picardie	3	12	7	6	10	4	4
Poitou-Charentes	2	6	8	5	9	6	6
Provence-Alpes-Côte-d'Azur	16	31	19	18	25	15	23
Rhône-Alpes	18	26	42	47	43	41	28
Total	202	271	299	268	317	298	277

3.1.3.2 DISTRIBUTION DES CAS SELON LA FORME CLINIQUE

Les formes cliniques ne sont pas systématiquement indiquées sur la feuille de renseignements accompagnant les souches, elles peuvent alors être obtenues lors d'échanges téléphoniques pour l'obtention d'informations complémentaires, voire dans de rares cas déduites du type de prélèvement.

Formes materno-néonatales

En 2011, 31 formes materno-néonatales (2010 : 43) ont été enregistrées, représentant 11 % du nombre total de cas sporadiques (Figure 10). Les formes maternonéonatales sont plus fréquemment rencontrées au second semestre comme en 2006-2010 (Figure 10). La distribution par région est indiquée dans le Tableau 5. Les années 2006, 2008 et 2011 ont été caractérisées par le plus faible nombre de cas de formes materno-néonatales depuis 1987 (Tableau 3). Les formes materno-néonatales ont une tendance à la décroissance depuis 1987 plus forte que les formes non materno-néonatales. Cette tendance est peut-être une conséquence des efforts de prévention réalisés en France chez les femmes enceintes.

Formes non materno-néonatales

En 2011, 246 formes non materno-néonatales ont été enregistrées (contre 255 en 2010), soit 88 % du total des cas sporadiques. Le Tableau 3 indique la répartition de ces formes non materno-néonatales.

Tableau 5. Répartition des formes cliniques de 2006 à 2011.

	2006	2007	2008	2009	2010	2011	Total
Formes non materno-néonatales							
Septicémies	170 (71%)	180 (69%)	152 (63%)	170 (62%)	156 (61%)	180 (73%)	1008
Infections du système nerveux central	54 (22%)	69(26%)	70 (29%)	85(31%)	73 (29%)	57 (23%)	408
Autres formes	16 (7%)	12 (5%)	19 (4%)	19 (7%)	26 (10%)	9 (4%)	101
Total	240	261	241	274	255	246	1517
Formes materno-néonatales							
Total	31	42	27	45	43	31	188
Total des formes cliniques	271	303	268	319	298	277	1459

- **La proportion et le nombre absolu d'infections du système nerveux central sont en diminution par rapport aux années précédentes.** Ce nombre de cas était assez stable depuis 2000, entre 40 et 60 cas/an malgré le pic observé entre 2008 et 2010 (Figures 12 et 13). Depuis 2008, le nombre de cas est voisin de ceux observés avant 1995.

- **Le nombre de formes septicémiques, a augmenté en valeur absolue et relative pour atteindre la valeur pic de 2007. Ce sont ces formes cliniques (voir plus bas) qui ont le plus augmenté en 2011 dans ces formes non materno-néonatales.** 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 et représentent de 4 % des cas non materno-néonatales (2006- 2010 : 5 à 10%). En 2011, le nombre de cas est plus faible qu'en 2010. Le Tableau 6 décrit la répartition de ces infections ou colonisations de 2006 à 2011.

Tableau 6. Répartition des autres formes cliniques de 2006 à 2011.

Autres formes	2006	2007	2008	2009	2010	2011	Total
Vasculaire	1	4	0	1	0	2	8
Adénopathie	1	0	0	0	1	0	2
Cardiaque	2	0	0	1	0	0	3
Os/articulaire	4	3	8	7	4	2	28
Digestif	0	1	0	0	1	1	3
Foie	1	0	2	2	1	0	6
Oedeme	1	1	2	2	6	0	12
Erysipèle	0	0	0	1	0	0	1
Infection du liquide d'ascite	5	3	6	3	10	3	30
Infection urinaire	0	0	0	1	1	0	2
Pneumopathie	0	0	1	1	2	1	5
Prostatite	1	0	0	0	0	0	1
Total	16	12	19	19	26	9	101

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

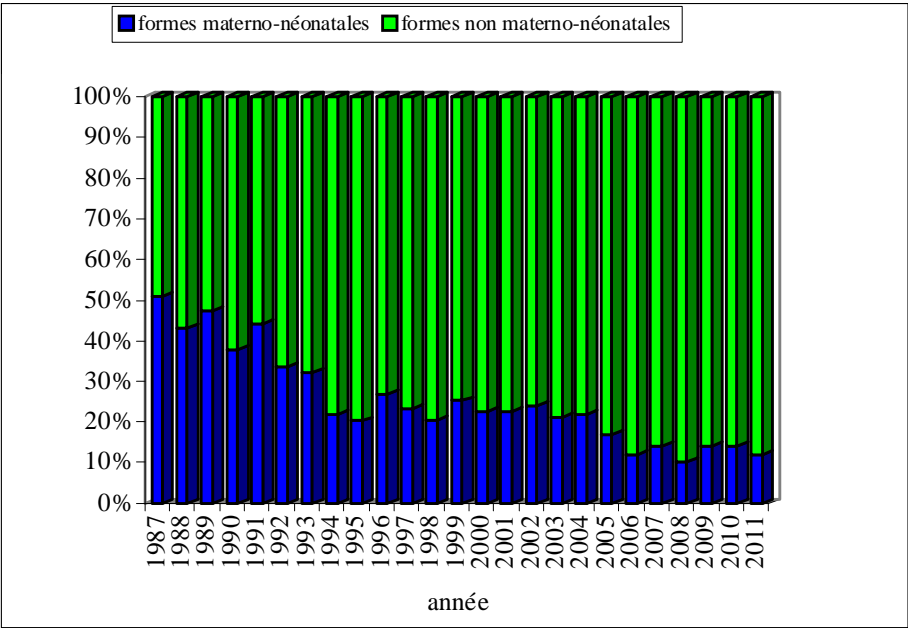


Figure 11 : Distribution mensuelle des cas sporadiques de listériose en France métropolitaine en 2011 selon la forme clinique.

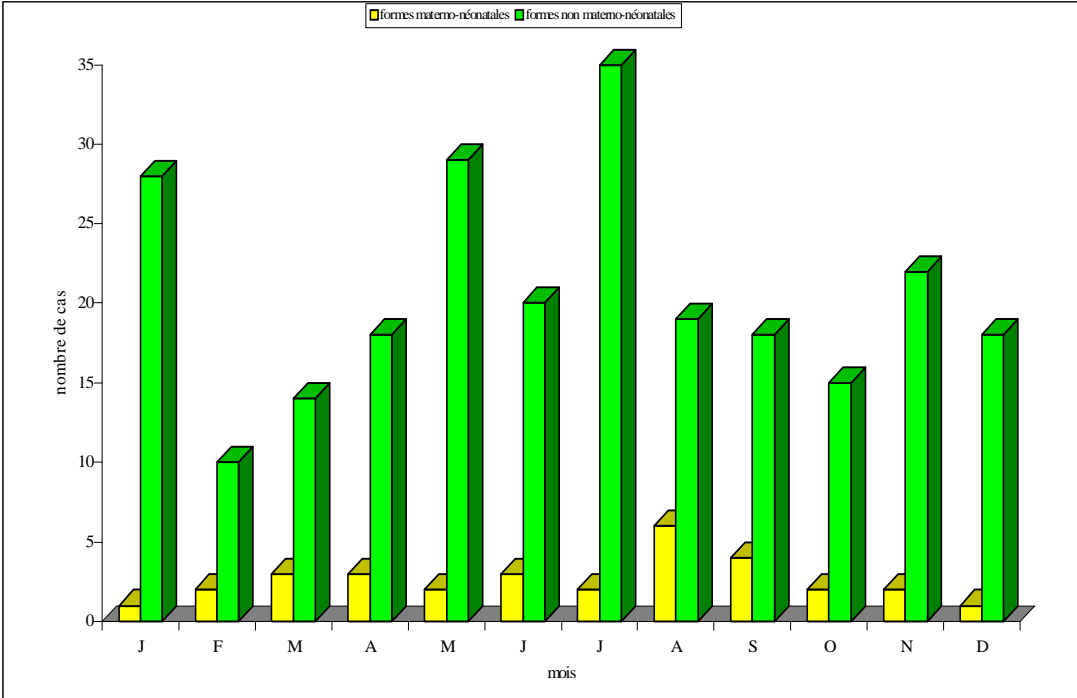


Figure 12 : Distribution des infections du système nerveux central et des septicémies pour les cas sporadiques de listériose en France métropolitaine depuis 1987.

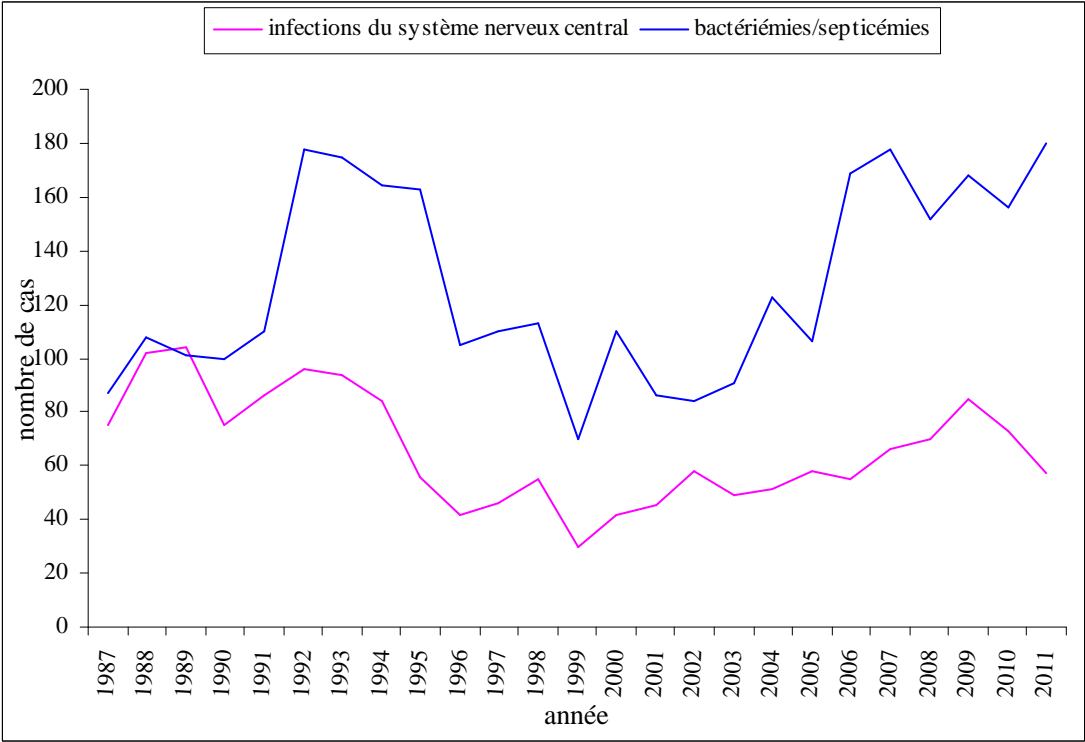
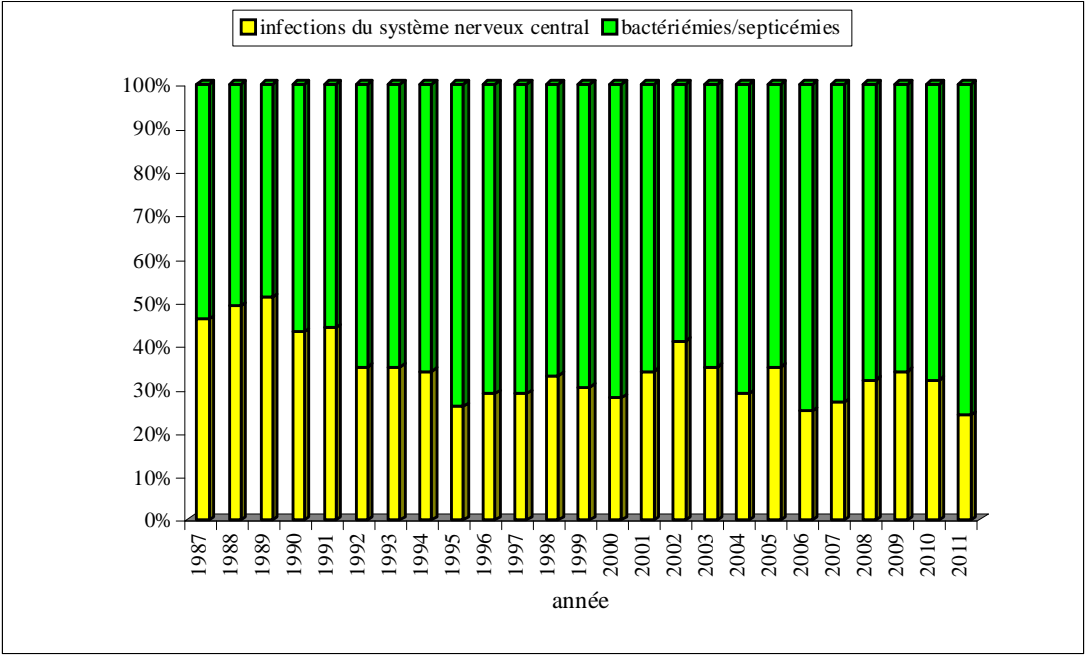


Figure 13 : Proportion des infections du système nerveux central et des septicémies pour les cas sporadiques de listériose en France métropolitaine depuis 1987.



Distribution régionale et temporelle

Les distributions régionales et temporelles des formes cliniques sont présentées dans les Tableaux 5 et 6 et les Figures 11 et 14.

Comme depuis 2009 et en 2007, deux régions, l'Île-de-France et Rhône-Alpes, ont un nombre élevé de formes non-maternonéonatales. Il en est de même pour les formes maternonéonatales dont l'Île-de-France a le nombre le plus élevé.

Comme pour les années 2006 à 2010, les formes septicémiques semblent plus souvent constatées de mai à septembre. Les infections du système nerveux central sont plus nombreuses durant le deuxième trimestre de l'année. Cependant, les formes autres qui étaient plus nombreuses le deuxième semestre, le sont en 2010 au premier semestre.

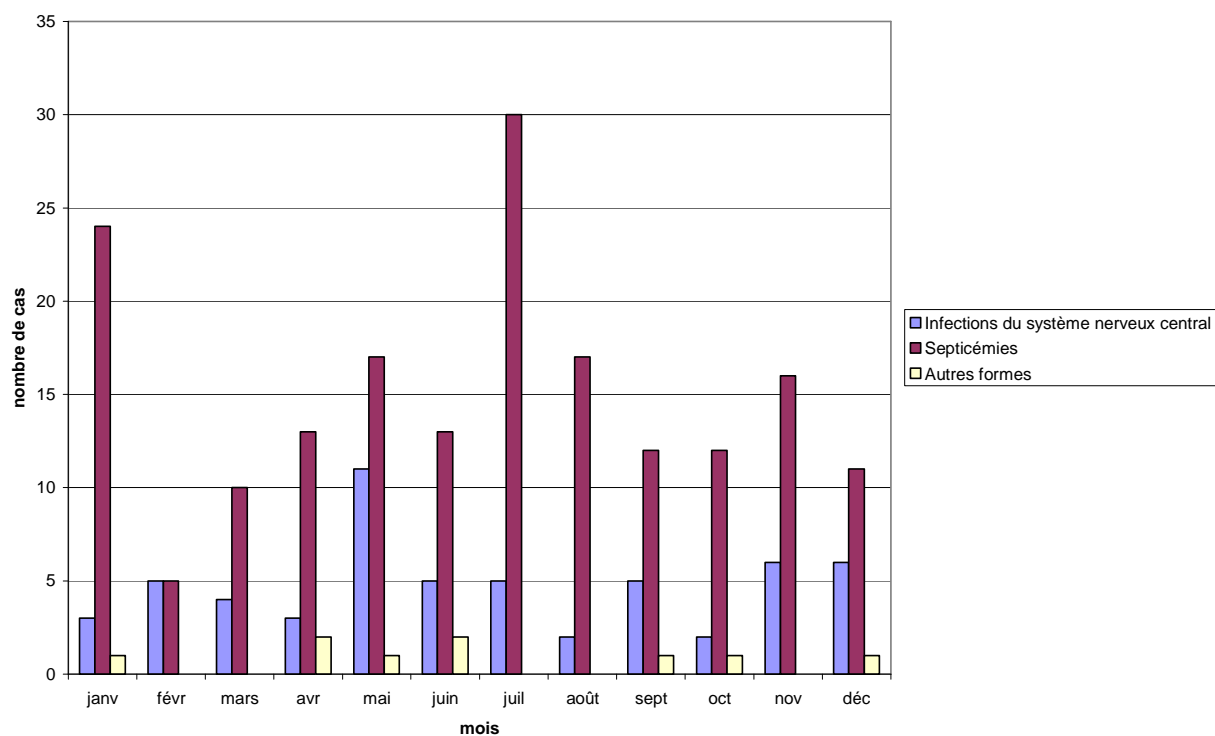
Tableau 5 : Distribution régionale des cas sporadiques de listériose en France Métropolitaine en 2011 selon la forme clinique.

Région	Total	Formes materno-néonatales	Formes non materno-néonatales
Alsace	7	1	6
Aquitaine	20	3	17
Auvergne	10	0	10
Basse-Normandie	7	0	7
Bourgogne	7	0	7
Bretagne	19	2	17
Centre	10	0	10
Champagne-Ardenne	12	1	11
Corse	1	0	1
Franche-Comté	8	0	8
Haute-Normandie	1	0	1
Île-de-France	49	11	38
Languedoc-Roussillon	9	3	6
Limousin	4	0	4
Lorraine	5	0	5
Midi-Pyrénées	12	0	12
Nord-Pas-de-Calais	21	4	17
Pays de la Loire	14	2	12
Picardie	4	0	4
Poitou-Charentes	6	0	6
Provence-Alpes-Côte-D'azur	23	3	20
Rhône-Alpes	28	1	27
Total	277	31	246

Tableau 6 : Distribution mensuelle des formes sporadiques de listériose non materno-néonatale en France métropolitaine en 2011.

Mois	Infections du système nerveux central	Septicémies	Autres formes	Total
J	3	24	1	29
F	5	5	0	12
M	4	10	0	17
A	3	13	2	21
M	11	17	1	31
J	5	13	2	23
J	5	30	0	37
A	2	17	0	25
S	5	12	1	22
O	2	12	1	17
N	6	16	0	24
D	6	11	1	19
Total	57	180	9	277

Figure 14 : Distribution mensuelle des formes sporadiques de listériose non materno-néonatale en France métropolitaine en 2011.



Terrain

L'existence ou non d'une affection sous-jacente ou concomitante était renseignée dans 246 cas soit 89% ce qui est constaté environ annuellement depuis 2006 (2010 : 255 cas, soit 86%). Pour 124 patients (50% des cas renseignés, contre 62% en 2010), 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. Les 122 patients restants (50 %) ne présentaient aucune affection concomitante ou sous-jacente connue. Cependant, l'âge de la plupart de ces patients (cf. ci-dessous) était de nature à constituer un facteur de risque. Le caractère non exhaustif de la collecte de ces renseignements cliniques 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 de la totalité des informations cliniques.

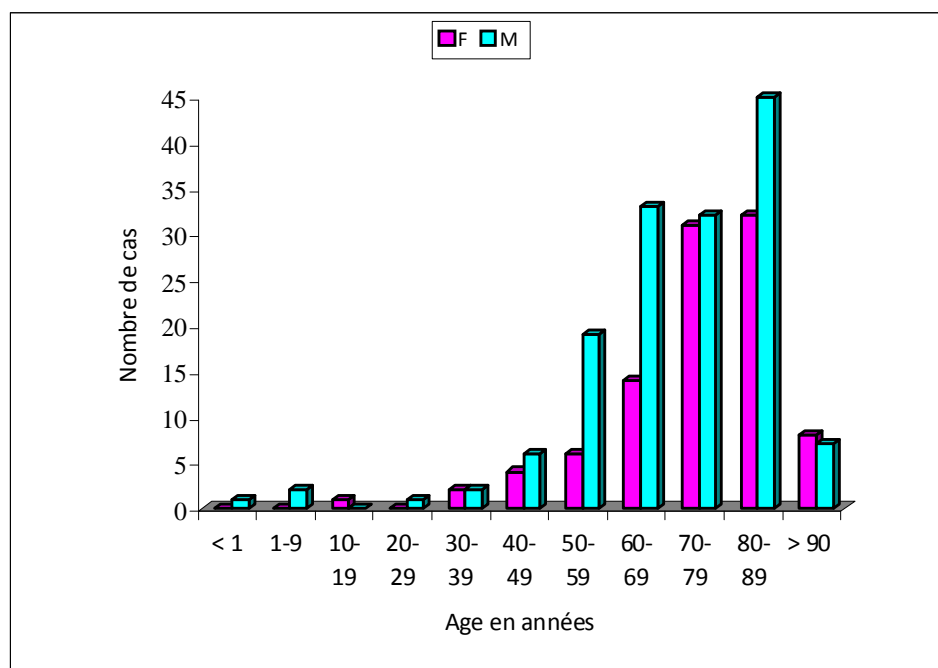
Age et sexe des patients avec listériose non materno-néonatale sporadique

En 2011, l'âge moyen était de 72 ans [<1 à 107 ans] ce qui est comparable aux valeurs annuelles depuis 2007 (69 ans). Dans 202 cas (82 %), l'infection est survenue après 60 ans, dans 40 cas (16 %) entre 21 et 60 ans et dans 4 cas (1,6 %) avant 21 ans, tous sexes et formes cliniques confondus (figure 15). En 2011, 2 cas masculin entre 0 et 9 ans dans le cadre d'une TIAC familial ont eut une listériose. La listériose chez l'enfant de plus de 1 an et l'adolescent est donc exceptionnelle mais a été constatée en 2011 ce qui nécessite l'investigation microbiologique de ces souches. Ces chiffres sont comparables à ceux obtenus entre 2006 et 2010. 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 comme entre 2006 à 2010. Cette relative prédominance de la listériose chez l'homme s'observe quelle que soit la forme clinique et est inexplicée (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 2011.

Sexe	Classe d'âge	Total	Infections du système nerveux central		
			Septicémies	Autres formes	
F	> 28 jours-20 ans	1	0	1	0
	21-60 ans	12	3	9	0
	> 60 ans	85	18	66	1
M	> 28 jours-20 ans	3	1	1	1
	21-60 ans	28	7	20	1
	> 60 ans	117	28	83	6
Total	> 28 jours-20 ans	4	1	2	1
	21-60 ans	40	10	29	1
	> 60 ans	202	46	149	7

Figure 15 : Distribution par classe d'âge et par sexe des formes sporadiques de listériose non materno-néonatale en France métropolitaine en 2011.



3.1.3.3 DISTRIBUTION DES SOUCHES SELON LE GROUPE PCR

Analyse générale

Les résultats obtenus pour les 277 (2010: 298) souches d'origine humaine de France métropolitaine sont présentés dans le Tableau 8.

Tableau 8. Répartition des groupes PCR par année depuis 2006.

Groupe PCR	Souches du sérovar	2006	2007	2008	2009	2010	2011
Ila	1/2a ou 3a	79(29%)	90(30%)	89(33%)	88(28 %)	100(34%)	85(31%)
Ilb	1/2b, 3b ou 7	47(17%)	45(15%)	27(10%)	47(14 %)	40(13%)	40(14%)
Ilc	1/2c ou 3c	11(4%)	14(5%)	11(4%)	24(8 %)	5(2%)	6(2%)
IVb + IVb-v1*	4b, 4d ou 4e	133+1(50%)	151+2(50%)	141(53%)	159(50%)	153(51%)	146(53%)
L	4ab ou 4c ou 4a	0 (0%)	1 (<1%)	0 (0%)	1 (<1 %)	0 (0%)	0 (0%)
Total		271	303	268	319	298	277

* variant du PCR Group IVb

Par rapport à l'année 2007, le CNRL n'a pas identifié de nouveau profil de groupe PCR pour les souches d'origine humaine, comme le IVb-v1. En 2011 comme depuis 2006, le groupe PCR majoritaire est le IVb représentant 50% des souches suivi du IIA puis IIb puis IIc puis L. Depuis 2006, il y a un équilibre entre la proportion de groupe PCR IVb et non IVb. Cette répartition n'est pas observée dans les souches alimentaires où les souches de groupe PCR Ila sont majoritaires (Figure 21). 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. Cependant, il faut noter une augmentation progressive des Ila au détriment des IIb dans les souches cliniques. Le groupe PCR IIc est faiblement représenté ce qui peut traduire une moindre virulence, du fait de la grande proportion de souches exprimant une InIA tronquée au sein de ce groupe.

↳ Pour 2011, 8 signalements ont été associés à des souches du groupe PCR IVb et 1 signalement au groupe PCR Ila ce qui est comparable à 2010 où le groupe IVb était majoritaire (cf. chapitre 3.3.3.). Cette prédominance du groupe PCR doit être surveillée mais semble refléter pour une partie des clones circulants sur le territoire.

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).

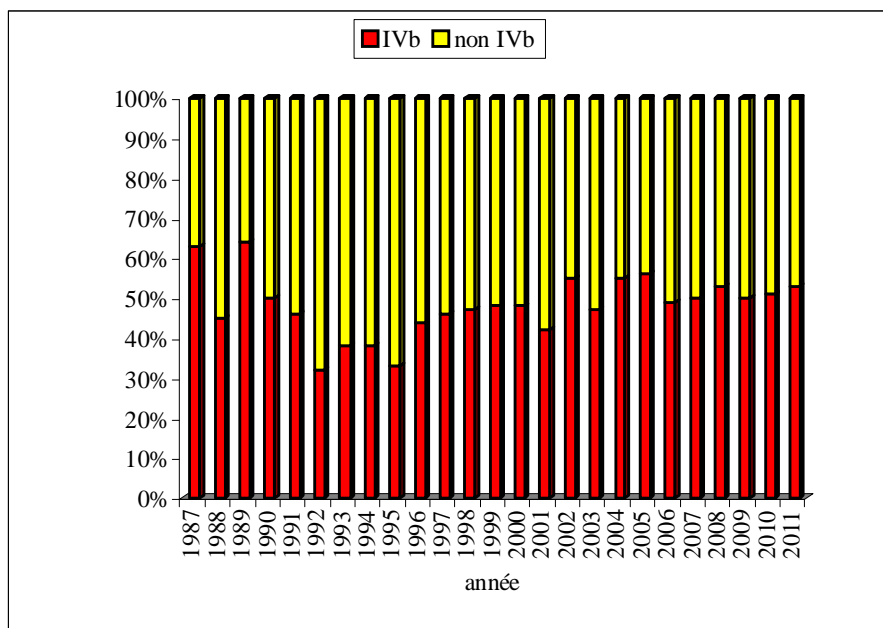
Distribution régionale des groupes PCR

La distribution régionale des souches par groupe PCR (Tableau 9) ne permet pas de mettre en évidence de distribution particulière pour chacun de ces groupes PCR.

Tableau 9 : Distribution régionale des cas sporadiques de listériose en France métropolitaine en 2011 selon les groupes PCR.

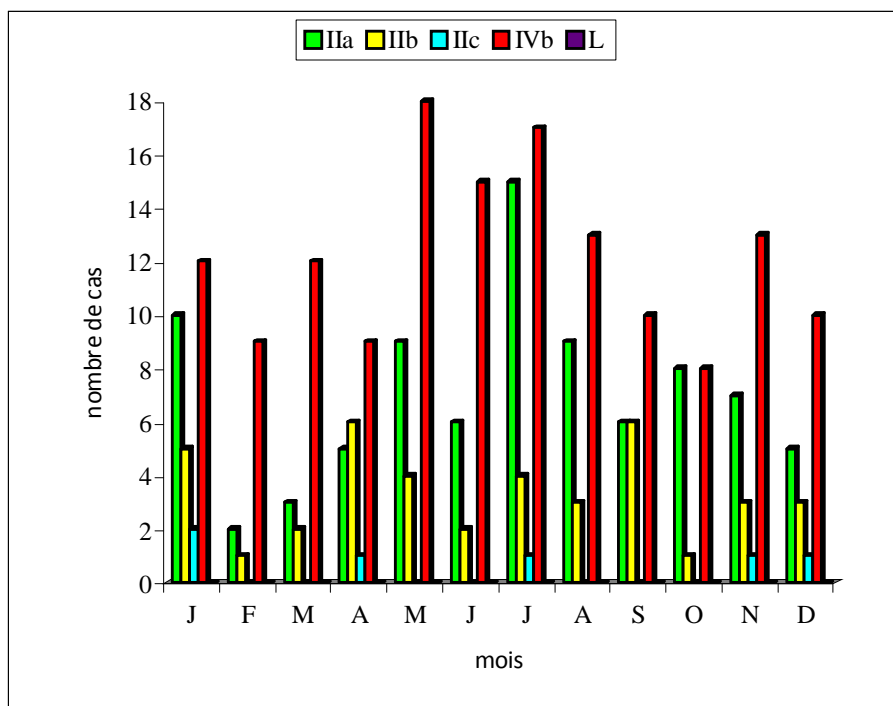
Région	Total	IIa	IIb	IIc	IVb
Alsace	7	2	1	0	4
Aquitaine	20	6	2	0	12
Auvergne	10	4	0	0	6
Basse-Normandie	7	0	0	2	5
Bourgogne	7	1	1	0	5
Bretagne	19	6	5	0	8
Centre	10	5	1	0	4
Champagne-Ardenne	12	4	4	1	3
Corse	1	0	1	0	0
Franche-Comté	8	3	1	0	4
Haute-Normandie	1	0	1	0	0
Ile-de-France	49	10	6	1	32
Languedoc-Roussillon	9	4	2	0	3
Limousin	4	2	0	0	2
Lorraine	5	3	0	0	2
Midi-Pyrénées	12	4	2	0	6
Nord-Pas-de-Calais	21	7	3	0	11
Pays de la Loire	14	6	2	2	4
Picardie	4	1	0	0	3
Poitou-Charentes	6	2	1	0	3
Provence-Alpes-Côte-D'azur	23	5	5	0	13
Rhône-Alpes	28	10	2	0	16
Total	277	85	40	6	146

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 2011.



Distribution des groupes PCR selon la forme clinique

Comme de 2006 à 2010, les souches du groupe PCR IVb (souches de sérovar 4b, 4d ou 4e) sont majoritaires, quelle que soit la forme clinique (Tableaux 10 à 13). Pour les septicémies, les deux groupes majeurs PCR sont le IVb puis le IIa. Pour les infections du système nerveux central, le groupe majeur PCR est le IVb puis le IIa. Pour les formes materno-néonatales, le groupe PCR majoritaire est le IVb suivi par le IIa et le IIb dans des proportions proches. Le groupe PCR IIc, plus rare, a été principalement associé à des septicémies.

Formes materno-néonatales

Tableau 10. Répartition des groupes PCR des souches de formes materno-néonatales de 2006 à 2011

	2006	2007	2008	2009	2010	2011
IIa (souches de sérovar 1/2a ou 3a)	3	7	3	5	9	5
IIb (souches de sérovar 1/2b, 3b ou 7)	5	6	0	7	9	6
IIc (souches de sérovar 1/2c ou 3c)	0	1	0	2	0	0
IVb + IVb-v1 (souches de sérovar 4b, 4d ou 4e)*	23	27+1	24	31	25	20
L (souches de sérovar 4ab, 4c, 4ab)	0	0	0	0	0	0
Total	31	42	27	45	43	31

* variant du PCR Group IVb

Formes non materno-néonatales

Tableau 11. Répartition des groupes PCR des souches des septicémies de 2006 à 2011.

	2006	2007	2008	2009	2010	2011
IIa (souches de sérovar 1/2a ou 3a)	53	62	61	56	59	70
IIb (souches de sérovar 1/2b, 3b ou 7)	31	32	19	28	19	26
IIc (souches de sérovar 1/2c ou 3c)	9	12	9	15	3	6
IVb + IVb-v1 (souches de sérovar 4b, 4d ou 4e)*	77	72+1	63	71	75	78
L (souches de sérovar 4ab, 4c, 4ab)	0	1	0	0	0	0
Total	170	180	152	170	156	180

* variant du PCR Group IVb

Tableau 12. Répartition des groupes PCR des souches des infections du système nerveux central de 2006 à 2011.

	2006	2007	2008	2009	2010	2011
IIa (souches de sérovar 1/2a ou 3a)	14	18	18	21	22	9
IIb (souches de sérovar 1/2b, 3b ou 7)	8	7	6	10	6	5
IIc (souches de sérovar 1/2c ou 3c)	2	0	1	7	1	0
IVb + IVb-v1 (souches de sérovar 4b, 4d ou 4e)*	29+1	44	45	46	44	43
L (souches de sérovar 4ab, 4c, 4ab)	0	0	0	1	0	0
Total	54	69	70	85	73	57

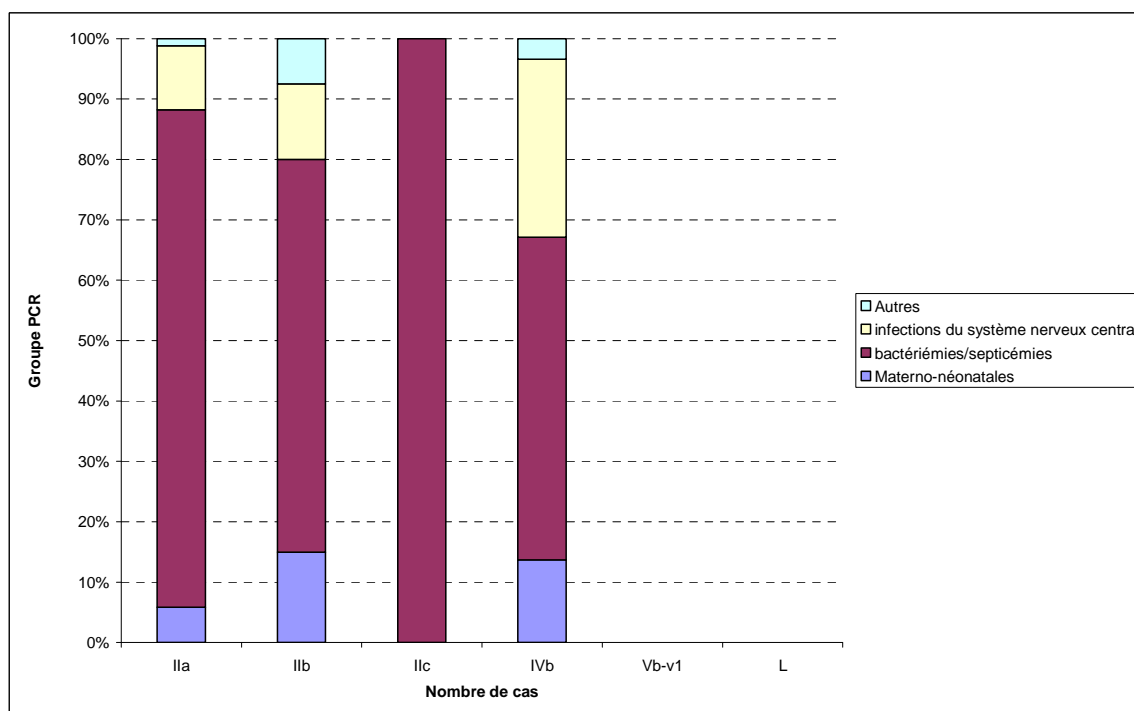
* variant du PCR Group IVb

Tableau 13. Répartition des groupes PCR des souches des autres formes de 2006 à 2011.

	2006	2007	2008	2009	2010	2011
IIa (souches de sérovar 1/2a ou 3a)	9	3	7	6	10	1
IIb (souches de sérovar 1/2b, 3b ou 7)	3	0	2	2	6	3
IIc (souches de sérovar 1/2c ou 3c)	0	1	1	0	1	0
IVb + IVb-v1 (souches de sérovar 4b, 4d ou 4e)*	4	8	9	11	9	5
L (souches de sérovar 4ab, 4c, 4ab)	0	0	0	0	0	0
Total	16	12	19	19	26	9

* variant du PCR Group IVb

Figure 18 : Distribution des groupes PCR des souches de *L. monocytogenes* en fonction des formes cliniques en France métropolitaine en 2011.



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 14). Les souches du groupe PCR IVb sont prédominantes quelle que soit la forme clinique (Figure 18) et ces souches sont plus fréquemment associées à des infections du système nerveux central. Les souches des groupes PCR IIa, IIb, IIc sont en proportion plus associées aux formes bactériémiques que les autres formes. Une hypothèse pouvant expliquer cette répartition est la constatation de la plus faible proportion d'expression d'InIA tronquées dans le groupe PCR IVb, de sa grande fréquence dans le groupe IIc, alors qu'InIA est impliquée dans la traversée des barrières intestinale et placentaire.

Tableau 14 : 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 de 2011.

Sexe	Classe d'âge	Total	Groupe PCR					L
			IIa	IIb	IIc	IVb	IVb-V1	
F	> 28 jours-20 ans	1	1	0	0	0	0	0
	21-60 ans	12	5	1	0	6	0	0
	> 60 ans	85	29	14	4	38	0	0
M	> 28 jours-20 ans	3	0	1	0	2	0	0
	21-60 ans	28	11	4	0	13	0	0
	> 60 ans	117	34	14	2	67	0	0
Total	> 28 jours-20 ans	4	1	1	0	2	0	0
	21-60 ans	40	16	5	0	19	0	0
	> 60 ans	202	63	28	6	105	0	0

3.1.4 CAS DE LISTERIOSE DANS LES DROM-TOM

En 2011, 6 cas sporadiques de listériose (contre 5 en 2010) ont été notifiés pour des patients résidant dans les DROM-TOM et sont décrits dans le Tableau 15.

La répartition relative par séro groupe PCR montre que les principaux groupes PCR sont retrouvés pour ces cas cliniques avec une prépondérance du groupe PCR IVb. Les effectifs étant faibles, il est difficile de tirer des conclusions sur les formes cliniques.

Tableau 15 : Distribution par forme clinique et groupe PCR des souches de *L. monocytogenes* isolées des cas provenant des DROM-TOM en 2011.

DROM/TOM Formes cliniques	Nombre	Groupe PCR			
		IIa	IIb	IIc	IVb
Réunion					
Bactériémie	2	1	0	0	1
Materno-néonatales	2	0	0	0	2
Guadeloupe					
Bactériémie	1	0	1	0	0
Guyane					
Materno-néonatales	1	0	0	0	1
TOTAL	6	1	1	0	4

3.1.5 ETUDE DE LA RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES

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 de l'EUCAST. Depuis janvier 2007, la sensibilité des souches humaines est déterminée prospectivement parallèlement à leur caractérisation. Ces antibiogrammes sont effectués sur un panel de 23 antibiotiques. Les souches détectées comme résistantes ou de sensibilités diminuées aux antibiotiques sont évaluées pour leurs concentrations minimales inhibitrices par E-test puis l'étude approfondie du mécanisme de résistance est effectuée le cas échéant. 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. 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 en 2011 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. Le CNRL investigate maintenant les tendances possibles à une sensibilité diminuée.

Toutes les souches étaient sensibles à l'érythromycine, linézolid, acide fucidique, vancomycine, et chloramphénicol. Sept souches présentaient une résistance à la ciprofloxacine. Deux souches présentaient une résistance à la tétracycline.

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.

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. La présence en 2007 d'une souche résistante au triméthoprime démontre qu'il convient cependant de surveiller attentivement l'émergence de souches résistantes, car cet antibiotique peut être proposé en cas d'allergies aux β -lactamines.

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 *Ascl* et *Apal*, 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. Depuis 2009, cette troisième enzyme a été intégrée en routine en cas de profils combinés *Ascl/Apal* 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 effectués 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 envoyés uniquement à la Cellule *Listeria* dans le cadre de la surveillance.

Le CNRL utilise le logiciel Bionumerics™ v6.6 pour l'analyse informatique des profils de macrorestriction d'ADN. Il est utilisé en routine pour la surveillance microbiologique de la listériose depuis 2006. Ce système informatique remplace partiellement la surveillance effectuée à l'œil qui était devenue difficilement gérable.

En 2010, pendant le workshop du congrès ISOPOL 2010 portant sur la mise en place d'un réseau européen de surveillance moléculaire des *Listeria monocytogenes* ainsi que lors de la réunion de la cellule *Listeria* fin 2010, le CNRL a proposé une nomenclature des souches se fondant 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 Ascl/Apal. Par exemple, la souche M-Ilc-301006/301006 est une souche de *Listeria monocytogenes* de groupe PCR Ilc de profil PFGE Ascl 301006 et de profil PFGE Apal 301006 ce qui simplifierait les écritures lors de la surveillance.

La cellule *Listeria* a accepté cette nomenclature, et elle est depuis présentée dans les tableaux de surveillance.

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 16) et, aux vues des données du CCOMS, également en dehors de France. Ces profils sont au nombre de 19 ce qui ne constitue pas une particulièrement une grande diversité mais démontre la présence de clones majeurs réapparaissant au cours des années. En 2011, seuls deux nouveaux profils sur les 9 signalements sont apparus, dont un avec un profil nouveau pour le territoire Français. Le profil 310801/310801 avait été signalé dans le rapport d'activité du CNRL 2010 comme très fréquent mais sans signalement encore.

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 les descendants de ces clones initiaux soient établis en France.

Par l'intermédiaire de cette analyse, le CNRL, lors de sa surveillance hebdomadaire de la listériose, évalue l'évolution des tendances en fréquence des souches alimentaires et humaines ayant ces profils particuliers prépondérants dans les signalements. Un signalement avec un profil rare permet de suspecter une souche d'une denrée importée et peut permettre une investigation épidémiologique plus «facile» qu'un profil largement circulant en France.

Tableau 16 : Distribution par profils Ascl et Apal et groupe PCR des signalements de 2006 à 2011.

Profils Ascl/Apal	Groupe PCR	Nombre de signalements par année						Nombre total de signalements
		2006**	2007	2008	2009	2010	2011	
271106/271106	Ila	1	0	0	0	0	0	1
241006/241006	Ila	0	0	0	1	0	0	1
020511/020511	IVb	0	0	0	0	0	1	1
310801/310801	Ilb	0	0	0	0	0	1	1
230908/180110bis	Ila	0	0	0	0	1	0	1
090507/180407	Ilb	0	1	0	0	0	0	1
210792/201194	IVb	1	0	0	0	0	0	1
160902/160902	IVb	1	0	0	0	0	0	1
200792/170407	IVb	0	1	0	0	0	0	1
180110/190110	IVb	0	0	0	0	1	0	1
301006/301006	Ilc	0	0	0	1	1	0	2
220803/200792	IVb	0	1	1	0	0	0	2
151005/111206	IVb	0	0	1	1	2	0	4
010901/020701	Ila	2	2	0	1	0	0	5
270801/050506	IVb	2	3	0	0	1	1	7
011001/160602	IVb	1	1	1	3	0	1	7
151005/151005	IVb	1	1	1	2	2	2	9
210792/210792	IVb	1	2	2	1	3	2	11
200792/200792*	IVb	1	4	3	1	2	1	12
Total		11	16	9	11	13	9	69

* 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

Dans le Tableau 18, on peut observer les fréquences majeures des profils de macrorestriction d'ADN des souches humaines en 2011.

Lorsque l'on regarde les profils de macrorestriction d'ADN des formes cliniques, il apparaît que quelque soit la forme (à l'exception des infections focales), les profils M-IVb-210792-210792 et M-IVb-2000792-200792 du groupe IVb sont majoritaires. Si l'on analyse l'ensemble des profils des souches humaines, il est intéressant de constater que pour les septicémies, la diversité des profils est plus importante, avec des groupes PCR Ila, Ilb, Ilc qui ne sont pas toujours retrouvés au cours des autres formes, ce qui témoigne de la possibilité d'un effet barrière moins fort au niveau de la barrière intestinale qu'au niveau des barrières placentaire et encéphalique.

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 l'apparition de nouveaux profils de macrorestriction d'ADN des souches humaines, cette apparition tend à diminuer (Tableau 18). Les profils majoritaires en fréquence sont ceux des signalements en général.

Tableau 17. Hiérarchisation des profils de macrorestriction d'ADN des souches humaines de 2011 dont la fréquence dépasse 3 souches humaines.

Profils de macrorestriction (Espèce-Groupe PCR-Pulsovar Ascl-Apal)	Total souches humaines	Total souches par formes cliniques*				Présence dans un signalement
		SEP	ISNC	AUT	MN	
M-IVb-071207-071207	3	1	2	0	0	
M-IIa-080507-020507	3	3	0	0	0	
M-IIa-260606-260606	3	3	0	0	0	
M-IIa-160907bis-031207	3	3	0	0	0	
M-IIb-231006-310801	3	0	2	0	1	
M-IIa-201107-201107	3	3	0	0	0	
M-IVb-180110-190110	3	1	2	0	0	
M-IVb-140907-070907	4	1	1	1	1	
M-IIa-241006-241006	4	3	1	0	0	L09/03,
M-IIb-010107-010107	4	3	0	1	0	
M-IVb-151005-220607bis	4	2	2	0	0	
M-IIb-310801-310801	4	3	0	0	1	L11/01
M-IIc-301006-301006	4	4	0	0	0	L09/08, L10/02,
M-IIa-010901-020701	6	6	0	0	0	L06/03, L06/10, L07/08, L07/12, L09/11
M-IVb-151005-111206	6	3	2	0	1	L08/08, L09/04, L09/07, L10/01, L10/10
M-IVb-020511-020511	7	3	3	0	1	L11/02
M-IVb-270801-050506	11	5	5	0	1	L06/05, L06/09, L07/02, L07/11, L07/16, L10/06, L11/04
M-IVb-011001-160602	15	8	3	0	4	L06/11, L07/13, L08/02, L09/02, L09/05, L09/10, L11/06
M-IVb-151005-151005	18	10	5	1	2	L06/04, L07/04, L08/06, L09/09, L10/05, L10/12, L11/07, L11/09
M-IVb-200792-200792	18	13	3	0	2	L06/07, L07/01, L07/03, L07/05, L07/10, L07/14, L08/01, L08/05, L08/09, L09/01, L10/07, L10/08, L11/03
M-IVb-210792-210792	21	10	5	1	5	L06/02, L07/07, L08/03, L08/07, L09/06, L10/04, L10/09, L10/11, L11/05, L11/08

*Sep : septicémie ; ISNC : infection du système nerveux central ; Aut : Autres ; MN : materno-néonatales.

Tableau 18. Fréquence et Nombre de pulsotypes Ascl/Apal de 2008 à 2011 en France métropolitaine

	2008	2009	2010	2011
Pulsotype déjà connu identifié une fois	96	96	84	94
Pulsotype identifié 2 -5 fois	26	24	33	31
Pulsotype identifié 6-12 fois	7	5	3	4
Pulsotype identifié >12 fois	2	6	5	4
Nouveaux pulsotypes identifiés*	57	44	28	25
Total des pulsotypes Ascl/Apal	268	319	298	277

* nouveau pulsotype avec l'enzyme Ascl et/ou Apal

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.

Les souches isolées lors de contrôles sanitaires (Alertes de la Direction Générale de l'Alimentation (DGAI) et de la Répression des Fraudes (DGCCRF), et d'investigations autour de cas humains) sont systématiquement adressées au CNRL. En dehors de ce contexte, chaque professionnel de l'industrie agroalimentaire (laboratoires privés ou public) peut envoyer ses souches pour caractérisation au CNRL. Dans ce cas, ces professionnels les expédient au CNRL ou au Laboratoire National de Référence de *Listeria monocytogenes* (LNRI) de l'ANSES à Maisons-Alfort. Le LNRI est destinataire des souches des plans annuels de surveillance et de contrôle *Listeria monocytogenes* conduits par la DGAI qui permettent d'estimer le niveau de contamination d'aliments de différentes filières. En 2008, une réunion entre la DGAI, l'InVS, le CNRL et le LNRI a permis de formaliser la destination des souches de *L. monocytogenes* françaises d'origine alimentaire. Depuis 2009, le flux des souches a été conforme à ce qui a été décidé lors de cette réunion.

3.2.1 ANALYSE GENERALE

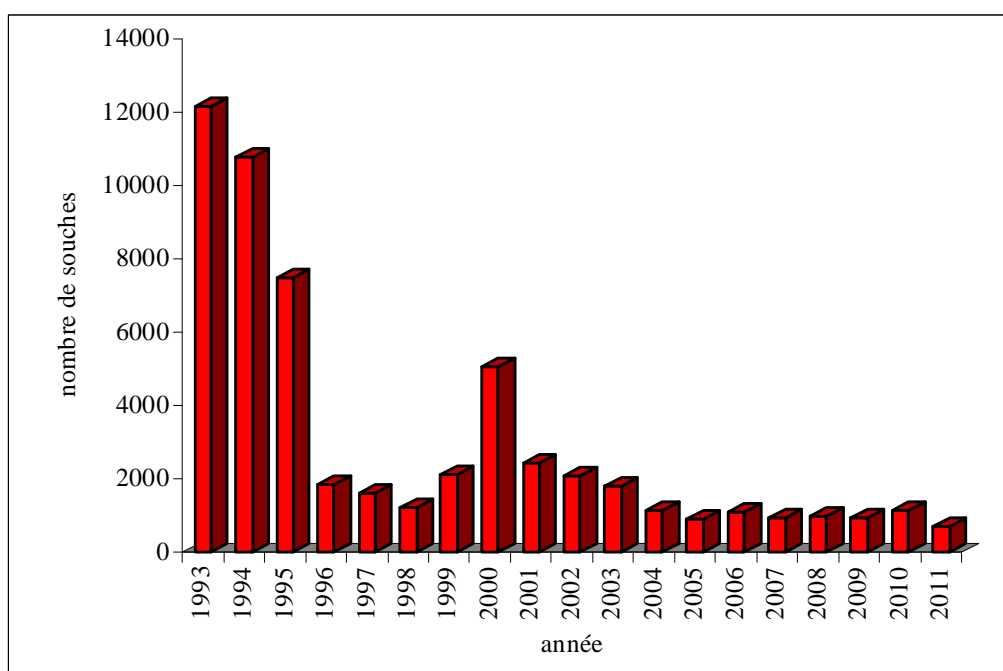
Cette activité consiste principalement à caractériser les souches isolées d'aliments ou de leur environnement, en particulier les souches de *L. monocytogenes* pour :

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

En 2011, 707 souches d'origine non humaine ont été adressées au CNRL par des laboratoires français (2010 : 1088 souches), soit une diminution de 35% par rapport à 2010 (Figure 19). Ce nombre est cependant relativement faible en raison de l'existence de destinataires multiples pour ce type de souches (LNRI ou autres laboratoires spécialisés type IFIP, ADRIA, AERIAL) et étant donné que l'envoi non légalement obligatoire au CNRL a un coût qui a pu être affecté par les difficultés économiques de l'année 2011.

La plupart de ces laboratoires utilisent des méthodes normalisées et 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. Malgré cette identification correcte, le CNRL constate que le taux de réception de souches contaminées nécessitant un réisolement est en augmentation ce qui entraîne des coups financiers supplémentaires.

Figure 19: Nombre annuel de souches d'origine non-humaine adressées par des laboratoires français depuis 1993.



La répartition des souches de 2011 suivant la catégorie de laboratoires était la suivante :

- Laboratoires Vétérinaires Départementaux (LVD) : 214 souches (30 %)[2010 : 443],
- Laboratoires privés d'hygiène alimentaire : 436 souches (63 %)[2010 : 584],
- Laboratoires Interrégionaux de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes : 44 souches (6 %)[2010 : 57],
- Laboratoire ANSES – LNRI : 3 souches (<1%)[2010 : 0],
- Laboratoire de recherche : 10 souches (1,5%)[2010 : 1].

La proportion de souches envoyées par les laboratoires vétérinaires départementaux (30% en 2011 contre 41% en 2010) baisse annuellement par rapport aux souches envoyées par les laboratoires privés d'hygiène alimentaire. Ces laboratoires privés ne connaissent pas toujours les règles sur la gestion des alertes produits ou comment envoyer les souches au CNRL.

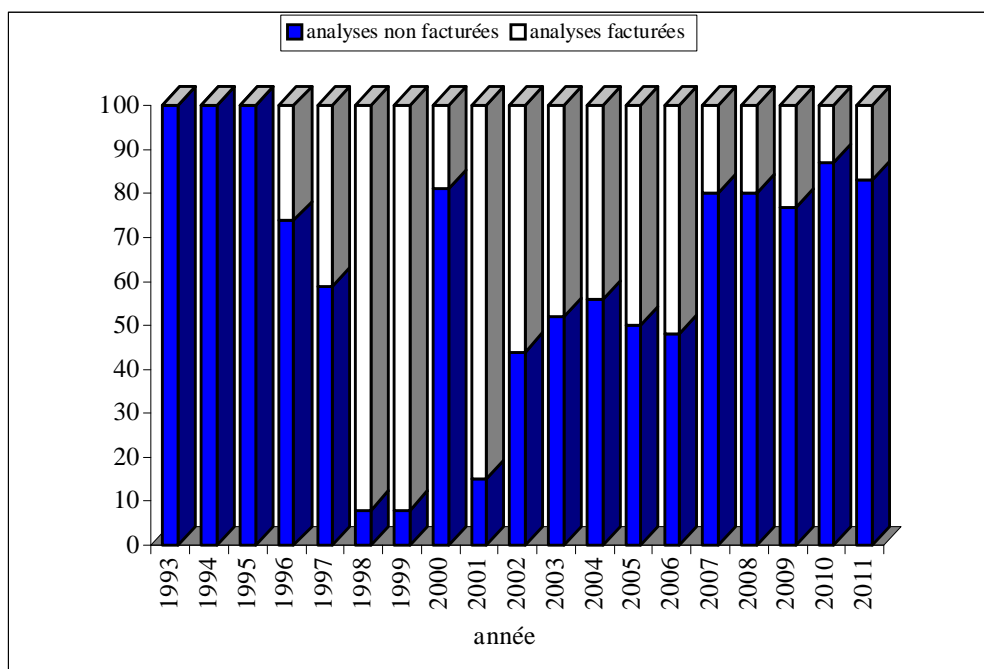
L'origine des souches était la suivante :

- souches isolées d'aliments : 594 souches (84 %)[2010 : 856],
- souches isolées de l'environnement : 101 souches (14 %)[2010 : 200],
- souches de recherche/sans information: 11 souches (2 %)[2010 : 27],
- souches isolées chez l'animal : 1 souche (<1 %)[2010 : 5].

Les proportions respectives des origines des souches sont globalement stables d'année en année depuis 2006. Les souches sans information sont des souches réceptionnées de laboratoires d'analyses privés pour caractérisation. Cette expertise est alors facturée au laboratoire demandeur. Cependant, le CNRL peut inclure ces données de caractérisation dans la surveillance nationale. En cas de problème de santé publique pouvant être relié à ces souches (Application de l'article R201-11 du Code rural), le CNRL peut, après en avoir informé son client, demander un complément d'informations sur les souches qui seront transmises le cas échéant aux autorités sanitaires. Les analyses effectuées sur les souches reçues dans le cadre de la surveillance, des alertes produits et des investigations autour de cas humains de listériose (signalements, enquêtes formes neuroméningées, alertes DGAI) sont prises en charge par le CNRL dans le cadre d'un accord entre le CNRL, la DGAI, l'InVS et la DGCCRF.

↳ En 2011, 17 % des essais ont fait l'objet d'une facturation (contre 13% en 2010) (Figure 20). Étant donnée la relative fragilité du système d'envoi volontaire des souches alimentaires ou environnementales vers le CNRL, le CNRL a décidé depuis 2007 de ne plus facturer les caractérisations de souches qui rentraient directement dans le système de surveillance français de la listériose. Ces souches sont traitées de façon confidentielle à la demande du client, et seuls 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 594 souches isolées d'aliments en 2011 (2010 : 856 souches), selon la catégorie de laboratoires, était la suivante :

- Laboratoires Vétérinaires Départementaux (LVD): 175 souches (29%)[2010 : 320],
- Laboratoires privés d'hygiène alimentaire : 372 souches (63%)[2010 : 476],
- Laboratoires Interrégionaux de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes: 44 souches (7%)[2010 : 57],
- Laboratoire ANSES LNRI : 3 souches (<1 %)[2010 : 0].

↳ **En 2011, le nombre de souches a diminué de 31% par rapport au nombre de 2010.** Au regard du nombre d'analyses de recherche et de dénombrement de *L. monocytogenes* en agriculture et pour l'environnement, le nombre de souches reçues n'est pas très élevé. Ceci peut s'expliquer par (i) la multiplicité des acteurs avec la mise en place récente du LNRI et la présence d'autres laboratoires spécialisés qui peut conduire à un effet de dilution, voire à des erreurs de destinataires selon le type de souches concernées ; (ii) 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*. Outre, leur facturation de leur caractérisation par le CNRL des souches d'origine alimentaire

non envoyées dans le cadre d'alertes sanitaires ; (iii) l'intégration systématique des souches d'origine alimentaire de ses clients dans la surveillance nationale et (iv) le coût en période de crise économique 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.

3.2.2.2 NOMBRE DE SOUCHES ET DISTRIBUTION PAR ESPECE

587 des 594 souches (2010 : 828 sur 856) ont été identifiées. Les analyses sur 7 souches (2010 : 17) n'ont pas été effectuées car il ne s'agissait pas de souches de *Listeria*.

La répartition par espèce des 587 souches de *Listeria* était la suivante :

- *L. monocytogenes* : 576 souches (98 %) [2010 : 813],
- *L. ivanovii* subsp. *ivanovii* : 1 souche (<1 %) [2010 : 1],
- *L. ivanovii* subsp. *londoniensis* : 1 souche (<1 %) [2010 : 0],
- *L. innocua* : 6 souches (1 %) [2010 : 9],
- *L. welshimeri* : 3 souches (<1 %) [2010 : 1],

La répartition par espèce démontre que l'application du règlement européen EC 2073/2005 modifié 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 (taux d'erreur <2 %).

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

↳ En 2011, les travaux de révision des deux normes analytiques NF EN ISO 11290 pour la recherche et le dénombrement des *L. monocytogenes* continuent d'élargir cette norme à la détection des *Listeria* spp. et *L. monocytogenes* tout en essayant de réduire le délai de rendu des résultats. Les *Listeria* spp. sont demandées comme bio-indicateur de présence éventuelle de *L. monocytogenes* par les Etats-Unis et les industriels français de l'agro-alimentaire. Par son mandat officiel, le CNRL est donc par sa non restriction à l'expertise des *L. monocytogenes* en situation d'assurer la confirmation de l'identification de ces souches non *monocytogenes*. Il est donc primordial qu'il participe à la taxonomie du genre *Listeria* et à la définition de nouvelles espèces qu'il caractérise en virulence dans le cadre de sa mission de santé publique.

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

L'origine des 576 souches (2010 : 813) de *L. monocytogenes* selon la catégorie d'aliment, était la suivante :

- viande et produits carnés : 218 souches (38%) [2010 : 419],
- lait et produits laitiers : 182 souches (32%) [2010 : 134],
- produits de la pêche : 93 souches (16 %) [2010 : 104],
- végétaux : 9 souches (1%) [2010 : 20],
- autres aliments : 68 souches (12%) [2010 : 132],
- Sans information : 6 souches (1%) [2010 : 4].

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 pour l'instant 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 19. Le groupe majoritaire est le groupe PCR IIa (sérovars 1/2a, 3a) représentant 63% des souches en 2011 comme depuis 2006 suivi du groupe PCR IVb (sérovars 4b, 4d et 4e) représentant 18% des souches puis 11% le groupe PCR IIb (sérovars 1/2b, 3b, et 7) et 8% le groupe PCR IIc (sérovars 1/2c, 3c). L'ensemble des groupes PCR II représentent 82 % (ce qui est environ la même proportion annuellement) des souches isolées, et sont majoritaires dans chaque catégorie d'aliment depuis 2006. 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 18 % des souches isolées des aliments (Figure 21). Le nombre de souches du groupe PCR IVb pour ces deux dernières années est stable sauf en 2010. Ce constat est également observable pour le groupe PCR II (IIa, IIb, IIc). En revanche, le groupe PCR IIc augmentant depuis 2008 décline en 2011.

Il est rapporté dans la littérature que le groupe PCR IVb est le plus virulent bien que les bases moléculaires de cette relative hypervirulence ne soient pas encore clairement établies. Cette virulence accrue pourrait notamment être expliquée par l'expression d'une InIA fonctionnelle ou/et la listeriolysine S.

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 que très rarement le cas pour les souches des sérovars 1/2c (Jacquet et coll., 2004, Lecuit et coll. 2004, Lecuit et coll. 2001, Disson et coll. 2008). La listeriolysine S, un facteur cytotoxique et hémolytique, codée par l'îlot de pathogénicité LIPI-3 (*Listeria* Pathogenicity Island-3) est présent uniquement dans les

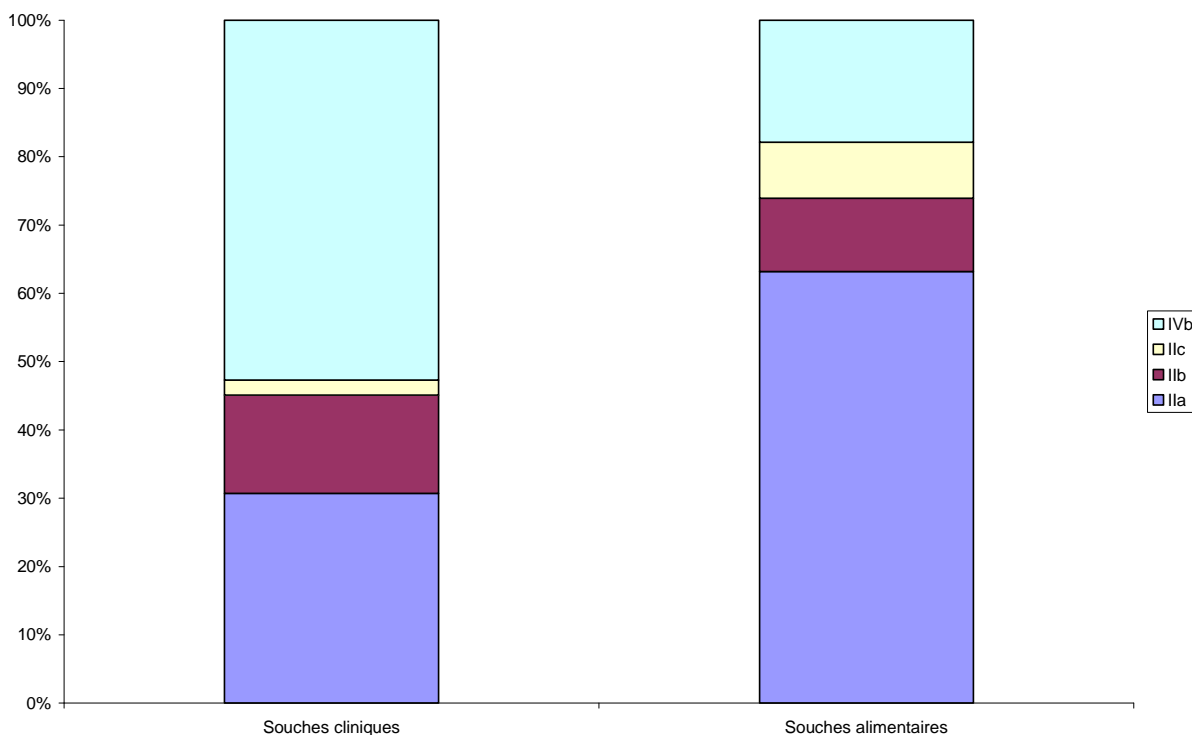
souches de la lignée I comprenant les sérovars 4b et 1/2b principalement associés aux cas humains sporadiques et aux épidémies de listériose (Cotter et coll., 2008). Ceci pourrait également rendre compte de la virulence accrue des sérovars 4b et 1/2b.

Tableau 19 : Distribution par groupe PCR et par catégorie d'aliments des 576 souches de *L. monocytogenes* reçues en 2011 de laboratoires français.

Groupe PCR	viande et produits carnés	lait et produits laitiers	produits de la pêche	végétaux	autres aliments	origine non précisée	Total
Ila	47	85	82	0	144	6	364 (63%)
Ilb	4	28	6	0	23	1	62 (11%)
Ilc	7	1	2	0	37	0	47 (8%)
IVb	10	68	3	6	14	2	103 (18%)
Total	68 (12%)	182 (32%)	93 (16%)	6 (1%)	218 (12%)	9 (1%)	576

Depuis 2009, le groupe PCR Ilb pour les autres aliments (plats cuisinés) a dépassé la proportion du groupe PCR IVb.

Figure 21 : Distribution des groupes PCR des souches de *L. monocytogenes* cliniques et alimentaires en 2011.



3.2.2.5 DISTRIBUTION DES SOUCHES DE *L. MONOCYTOGENES* PAR PROFILS DE MACRORESTRICTION

Dans le chapitre 3.1.3.3. sont présentés les principaux profils de macrorestriction pour les souches humaines : le groupe PCR IVb est hyperreprésenté sauf pour les bactériémies où le groupe PCR IIa était aussi représenté. Il est intéressant de documenter la présence de ces profils dans les aliments. Ces données ne concernent que les souches alimentaires pour lesquelles un typage par macrorestriction d'ADN a été réalisé.

D'après le tableau 20, on peut observer que :

- Des profils majoritaires dans les souches alimentaires sont retrouvés dans ceux des souches cliniques et des signalements.
- Les profils majoritaires dans les souches humaines ne sont pas associés au plus grand nombre de souches alimentaires.

Des profils majoritaires dans les souches alimentaires ne se retrouvant pas dans les souches cliniques peuvent être des souches avirulentes ou hypovirulentes ou des candidats aux signalements futurs à surveiller.

En 2011, 15% des souches typées présente un profil unique (contre 9% entre 2006-2010).

Tableau 20. Profils de macrorestriction majoritaires (>5) en 2011 pour les souches alimentaires

Profils de macrorestriction (Espèce-Groupe PCR-Pulsovar Ascl- <i>Apal</i>)	Nombre de souches alimentaires	Présence dans les profils des souches cliniques majoritaires (>3)	Nombre de signalements 2011 avec ce profil
M-IIa-050207-050207bis	5		
M-IIa-080507-020507	5	X	
M-IIa-241006-241006bis	5		
M-IIb-050307-310801	5		
M-IVb-270801-050506	5	X	1
M-IIa-280311-280311	5		
M-IIa-230905-241006	6		
M-IVb-151005-151005	6	X	2
M-IIa-241006-230905bis	8		
M-IVb-241007-050506	8		
M-IIb-090507bis-180407bis	8		
M-IIa-010901-020701	9	X	
M-IIa-050911-250208	10		
M-IIa-230905-230905	11		
M-IVb-210792-210792	13	X	2
M-IIb-310801-310801	15	X	1
M-IIa-271006-050207	16		
M-IIa-160907bis-230608bis	23		
M-IIc-301006-301006	25	X	
M-IVb-011001-160602	28	X	
M-IIa-100608-230905	31		
M-IIa-241006-241006	72	X	

3.2.3 SOUCHES ISOLEES DE L'ENVIRONNEMENT

En 2011, 101 souches (2010 : 200) provenant de l'environnement ont été reçues au CNRL, adressées par les Laboratoires Vétérinaires Départementaux [38 (38 %)] et des laboratoires privés [63 (63%)]. La nette augmentation constatée en 2010, qui 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 ne s'est pas vérifiée en 2011.

Il s'agissait dans 98 cas (97 % ; 2010 : 186) de souches de *L. monocytogenes*, dans 2 cas de souches de *L. innocua* et dans 1 cas une souche de *L. ivanovii subsp. londoniensis* qui est une souche rare.

La répartition par groupe PCR des 98 souches de *L. monocytogenes* est la suivante :

- groupe PCR IIa (sérovars 1/2a et 3a) : 36 souches (37 %) [2010 :67],
- groupe PCR IIb (sérovars 1/2b, 3b et 7) : 12 souches (12 %) [2010 :23],
- groupe PCR IIc (sérovars 1/2c et 3c) : 35 souches (36 %) [2010 :39],
- groupe PCR IVb (sérovars 4b, 4d et 4e) : 15 souches (15 %) [2010 :57].

Comme pour les souches isolées d'aliments, les souches des groupes PCR IIa, IIb et IIc sont majoritaires, soit 75 % des souches de *L. monocytogenes* isolées de l'environnement. Cependant, la remontée depuis 2009 des souches de *L. monocytogenes* du groupe PCR IVb est à surveiller car pouvant contaminer des ateliers ou des équipements. En revanche, le groupe PCR IIc remonte depuis 2010. Ceci peut être biaisé par l'échantillon de souches d'environnement envoyées au CNRL.

Les profils de macrorestriction d'ADN majeures associées aux souches de l'environnement (fréquence >3) sont par ordre décroissant : M-IIa-241006/241006 ; M-IVb-040410-200308 ; M-IIa-160907bis-230608is ; M-IIc-301006-301006. On retrouve ceux des souches alimentaires majoritaires sauf pour le M-IVb-040410-200308.

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. Elles ne correspondent pas à des souches véritablement isolées de l'environnement (sol, eau, boue) qui seraient utiles pour effectuer des études comparatives phylogénétiques, de virulence, d'acquisition/sélection de gènes, avec les souches alimentaires et cliniques.

3.3 BILAN DES INVESTIGATIONS, SIGNALEMENTS ET ALERTES

Le détail des signalements et les investigations qui en découlent sont des informations confidentielles de la Cellule *Listeria*. Ils ne peuvent faire l'objet d'une analyse détaillée dans ce rapport d'activités et ne peuvent pas être divulgués à des tiers sans autorisation. Ces informations sont à la disposition de l'InVS au CNRL.

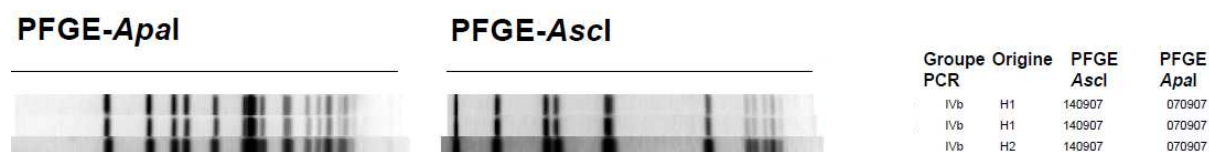
3.3.1 SUSPICIONS D'INFECTIONS NOSOCOMIALES

À 5 reprises en 2011 (contre 7 en 2010), le diagnostic de plusieurs cas de listériose groupés temporellement et géographiquement (même hôpital, voire même service) a fait suspecter une source nosocomiale. Une infection nosocomiale dans un Centre Hospitalier a été établie à partir d'une trancheuse (Figure 23). Toutes souches d'un même centre de soins sur une période de moins de 15 jours qui ne sont pas des doublons sont signalées à l'InVS et investiguées.

3.3.2 INVESTIGATION D'UNE TIAC

Dans une famille ayant consommé un pâté, un enfant a été atteint d'une infection du système nerveux central. Les selles du frère et de la sœur de cet enfant, qui présentaient une diarrhée, ont été étudiées. Une souche de *L. monocytogenes* a pu être uniquement isolée des selles du frère de cet enfant et était de caractéristiques microbiologiques similaires à celles de cet enfant (Figure 22).

Figure 22: Résultat de typage de PFGE dans une investigation de TIAC. La souche du patient H1 est similaire à la souche de son frère H2.



Il s'agit d'une description rare d'une TIAC à *Listeria monocytogenes* alors que ce pathogène ne fait pas partie des agents de TIAC.

3.3.3 SIGNALEMENTS

En 2011, la procédure de signalement a été conforme aux 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 où 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 (ex : L07/xx). Pour plus de clarté, la description des signalements effectués fera référence aux 2 nomenclatures (Tableau 21).

En 2011, le CNRL a effectué 9 signalements [2006-2010 moyenne 9-16 par an ; 2010 : 13] pour des souches majoritairement du séro groupe PCR IVb (89%), le plus virulent et à l'origine de nombreuses épidémies, puis du séro groupe PCR IIa (11%) (Tableau 21). A la connaissance du CNRL, aucune source commune n'a pu être identifiée pour ces 9 signalements. Le groupe PCR IIb a donné un signalement comme en 2007. Le CNRL avait mis sous surveillance le groupe PCR IIc en 2008 pour un profil particulier, le M-IIc-301006-301006, dont la fréquence s'était particulièrement accrue, mais aucun signalement ne lui fut relié en 2011.

Le nombre annuel de signalements est globalement stable. Un signalement 2011 (L11/09) a été clôturé en 2012. Deux signalements L11/02, L11/08 ont donné lieu à une réunion téléphonique de la cellule *Listeria* mais sans identification de l'aliment responsable après les investigations. Aucun signalement n'a été suivi du déclenchement de la phase d'Alerte.

Les signalements en 2011 ont concerné 127 souches (2010 : 130).

L'analyse des profils de macrorestriction d'ADN des souches de signalements est présentée dans le chapitre 3.1.6.

Tableau 21 : Synthèse des signalements effectués par le CNRL en 2010 et rappel des signalements de 2011.

Signalement	ex numérotation	Date du signalement	Date de cloture	Caractéristiques des souches		
				Groupe PCR	Profil Ascl	Profil Apal
L10/11	04/10/2010	04/10/2010	06/01/2011	IVb	210792	210792
L10/12	25/10/2010	25/10/2010	29/11/2010	IVb	151005	151005
L10/13	25/10/2010	25/10/2010	15/11/2010	IIa	230908	180110bis
L11/01*	31/01/2011	31/01/2011	21/02/2011	IIb	310801	310801
L11/02*	23/05/2011	23/05/2011	21/06/2011	IVb	020511	020511
L11/03	21/06/2011	21/06/2011	26/09/2011	IVb	200792	200792
L11/04	21/06/2011	21/06/2011	02/11/2011	IVb	270801	050506
L11/05	04/07/2011	04/07/2011	01/08/2011	IVb	210792	210792
L11/06	25/07/2011	25/07/2011	12/09/2011	IVb	011001	160602

L11/07	16/08/2011	16/08/2011	07/11/2011	IVb	151005	151005
L11/08	05/09/2011	05/09/2011	16/11/2011	IVb	210792	210792
L11/09	12/12/2011	12/12/2011	20/02/2012	IVb	151005	151005

* Nouveau profil de signalement depuis 2010

Tableau 22 : Signalements de listériose, signalement associé à des cas associés et des cas sporadiques, France, 2000-2010 (modifié de Goulet et coll., 2008)

Caractéristiques	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
Nombre de signalements détectés	9	4	10	11	13	11	11	16	9	11	13	9
Nombre de cas appartenant à un signalement	53	21	70	78	88	65	98	106	58	87	85	61
Nombre de cas n'appartenant pas à un signalement	210	167	150	131	148	156	192	213	214	230	213	216

3.3.4 ALERTES PRODUITS DGAL

Il s'agit d'identifier les souches à l'origine de cas cliniques 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 RASFF. En 2008, un changement a été effectué en cours d'année, afin de ne remonter les rapports à la cellule *Listeria*, que sur les trois derniers mois au lieu des six derniers pour les souches humaines présentant les mêmes caractéristiques que celles isolées de produits alimentaires contaminés par *L. monocytogenes*. Ce changement a été motivé par le fait de la période d'incubation maximale de la listériose chez l'homme, qui est évaluée à 70 jours.

Un bilan des alertes produits a été examiné lors de la réunion de la cellule *Listeria* du 26 Novembre 2010. Il a été convenu sur proposition du CNRL d'une optimisation des échanges d'informations relatifs aux alertes produits, par la réalisation et l'envoi d'un tableau unique de suivi comportant la nouvelle nomenclature de caractérisation des souches du CNRL, en remplacement d'emails individuels pour alerte. Ce tableau a été mis en application au 1^{er} Janvier 2011.

➔ En 2011, 495 souches (659 souches en 2010) ont été adressées au CNRL dans le cadre des 282 alertes produits DGAL et DDPP (314 en 2010). Le nombre de souches par alerte produit variait de 1 à 22 souches. En 2011, le CNRL a réceptionné des souches d'alertes produits de St-Pierre-et-Miquelon.

- En 2011, 371 alertes produits ont répertoriés par la DGAI.

Le taux d'exhaustivité de récupération des souches d'alertes déterminé est de 76% en 2011, contre 81% en 2010. Par l'intermédiaire d'échanges entre la DGAI, le LNR, l'InVS et le CNRL d'un tableau récapitulatif des alertes produits, les relances par la DGAI auprès des DDPP et des laboratoires puis par le CNRL se sont intensifiées.

100% des souches de *Listeria* issues d'aliments analysés spécifiquement pour *L. monocytogenes* dans le cadre des alertes produits ont été confirmées comme *L. monocytogenes* (2010 : 98%). L'impact économique pour l'opérateur agro-alimentaire n'est pas négligeable en cas d'identification erronée. Aucun lien entre une alerte produit et des cas humains n'a pu être établie à la connaissance du CNRL.

La répartition par groupe PCR des 495 souches de *L. monocytogenes* issues d'aliments et d'échantillons de l'environnement analysés spécifiquement pour *L. monocytogenes* dans le cadre des alertes était la suivante:

- groupe PCR IIa (sérovars 1/2a et 3a) : 309 souches (62%),
- groupe PCR IIb (sérovars 1/2b, 3b et 7) : 67 souches (14%),
- groupe PCR IIc (sérovars 1/2c et 3c) : 40 souches (8 %),
- groupe PCR IVb (sérovars 4b, 4d et 4e) : 79 souches (16 %).

Les profils *Ascl/Apal* de *L. monocytogenes* majoritairement retrouvés (>10 en 2011) dans les alertes produits sont le M-IIa-241006-241006, M-IIa-100608-230905, M-IIc-301006-301006, M-IIa-160907bis-230608bis, M-IVb-011001-160602, M-IIa-271006-050207, M-IIb-310801-310801, M-IIa-230905-230905. Seulement 3 des profils précédents ont été retrouvés parmi les souches majoritaires humaines.

3.3.5 ALERTES PRODUITS 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 2011 pour *Listeria* et lors d'inspection. Certaines de ces alertes portent un numéro DGAI si le CNR en a la connaissance et la traçabilité.

En 2011, 12 souches (2010: 34 souches) ont été réceptionnées dans le cadre de 11 alertes DGCCRF qui étaient uniquement des *L. monocytogenes* (certaines d'entre elles étaient communes avec les alertes produits de la DGAI).

3.3.6 ALERTE EUROPEENNE

En 2011, le CNRL a été informé de 13 alertes européennes RASFF surtout sur des produits de la pêche fumé type saumon ou truite de mer.

3.3.7 COOPERATION DES SYSTEMES DE SURVEILLANCE FRANCE-BELGIQUE DANS LE CADRE D'UNE EPIDEMIE BELGE

Article soumis à Epidemiology and Infection. M. Yde, M. Naranjo, W. Mattheus, P. Stragier, B. Pochet, K. Beulens, K. De Schrijver, D. Van Den Branden, V. Laisnez, W. Flipse, A. Leclercq, M. Lecuit, K. Dierick, S. Bertrand. Usefulness of the Epidemic Intelligence Information System in the management of an outbreak of listeriosis, Belgium, 2011.

Un groupe de cas liés dans le temps et l'identification d'une souche clonale suggère l'occurrence d'une épidémie à *Listeria monocytogenes* en Belgique en 2011, vraisemblablement en raison de la consommation d'un fromage à pâte dure fait à base de lait pasteurisé et produit par un fabricant de la Belgique. Le clone épidémique a été identifié comme *L. monocytogenes* serotype 1/2a, sensible à l'arsenic et le cadmium et de type MLST 37. L'enquête alimentaire de cette épidémie a été facilitée par le Système d'information d'Intelligence Épidémique et les données échangées entre les systèmes de surveillance français et Belge. Le système français ayant pu détecter le profil des souches humaines belges dans sa surveillance nationale au niveau de souches d'alertes produits ce qui a permis d'identifier le produit incriminé dans cette épidémie.

3.3.8 ENQUETE DES FORMES NEUROMENINGEES ET AUTRES FORMES

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

On définit un cas de forme neuroméningée comme tout cas de listériose avec une date de diagnostic (date d'isolement de la souche) comprise entre le 1^{er} janvier et le 31 décembre d'une année donnée 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 DDPP.

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 *Ascl*, *Apal* 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 de pulsotype similaire à celui du cas humain à la Cellule *Listeria*.

Historiquement, ces enquêtes ont été limitées aux formes neuroméningées en raison de leurs caractéristiques cliniques et notamment leur durée d'incubation relativement plus courte (en général moins de 15 jours).

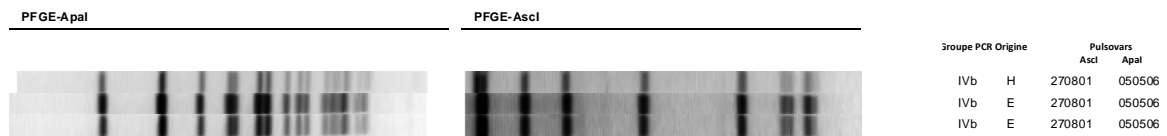
En juin 2011, le processus des enquêtes sur les formes neuroméningées a été révisé et le CNRL a participé à cette révision et applique depuis ce nouveau processus ou circuit CIRE.

En 2011, sur les 57 cas de listérioses recensés comme neuroméningées auprès du CNRL par les cliniciens, **ces investigations demandées au CNRL par l'InVS ont concerné 55 cas (2010 : 60) répartis sur toute la France donc 96% (82% des cas de listérioses neuroméningées en 2010) des infections du système nerveux central identifiées par le CNRL en 2011.**

Un bilan sur 17 mois (août 2001-décembre 2002) de fonctionnement a été publié en 2004 (Richard et coll., 2004). Les données pour 2005, 2006, 2007, 2008, 2009, 2010 et 2011 sont respectivement 69 %, 59 %, 62%, 77%, 82%, 82% et 96% de cas neuroméningés inclus dans l'enquête contre 88 % en 2003 et 12% de cas avec prélèvements positifs en 2011 contre 41 %, 17 %, 16%, 33%, 26%, 14%, 15% en 2003, 2005, 2006, 2007, 2008, 2009 et 2010 respectivement.

Ainsi, les prélèvements à domicile proposés systématiquement à tous les cas de listériose neuroméningée paraissent un complément utile à la surveillance de la listériose réalisée par la DO et le CNRL et permettent dans certains cas d'identifier rapidement la source de contamination. Dans un cas, l'ARS a suspecté une infection nosocomiale.

Figure 23 : Exemple de résultat de typage de PFGE dans une investigation d'un cas de forme neuroméningée. La souche d'environnement d'une trancheuse est similaire à la souche du patient (*Légende : H : humain A : clinique*)



3.3.9 CONCLUSIONS

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 des variations 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.). Sans avoir encore identifié la cause de l'augmentation récente du nombre de cas en 2006, il semble que le nombre de cas diminue après une stabilité.

En 2011, un grand nombre de cas similaire aux années 1995 a été observé. 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

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 au risque *Listeria*. Outre sa bibliothèque interne sur le sujet, le CNRL a développé plusieurs supports de diffusion de l'information [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].

4.1 SITE INTERNET

Le CNRL/CCOMS des *Listeria* dispose d'un site internet bilingue français/anglais (<http://www.pasteur.fr/cnr/Listeria>). 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 éventuellement un lien avec le site Internet du CNRL.

Depuis 2011, il effectue hebdomadairement une veille Internet ou infoépidémiologie et fait remonter des informations aux autorités de santé si nécessaire ou des phénomènes anormaux relatives à *Listeria* qui n'ont pas fait l'objet d'une communication parmi les membres de la cellule *Listeria*.

Les cadres du CNRL participent au Réseau de Microbiologistes Médicaux (R2M) afin de répondre le cas échéant à toutes questions spécifiques sur la listériose ou demandes de bibliographie sur ce sujet.

4.2 COURS ET CONFERENCES SUR INVITATION

En 2011, les collaborateurs du CNRL ont donné 2 cours pour la formation des chefs de laboratoires, techniciens, responsable qualité du secteur agro-alimentaire et hygiénistes des hôpitaux sur le sujet :

- Cours sur « *Listeria monocytogenes* », ADRIA Développement de Quimper, formation continue « Bactéries pathogènes en alimentaire », Rennes, le 21/09/11, A. Leclercq.

- Cours sur les *Listeria*, Institut Pasteur de Lille, Lille, Cours Cours International de Microbiologie des Aliments, 16/05/11, A. Leclercq.

Comme décrit dans le chapitre 6, le CNRL participe à des conférences sur invitation aux niveaux national et international.

4.3 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 2011, l'Ingénieur du CNRL et les responsables ont encadré un étudiant: Carlos Soto Alvarez, M2, Master Sciences et technologie, Mention Biologie moléculaire et cellulaire, « Diversité génétique et potentiel de virulence des souches de *L. monocytogenes* », Juin 2011, Paris.

4.3.1 DEMANDE D'INFORMATIONS ET DE CONSEILS

Le CNRL a reçu en 2011 environ 520 demandes d'information/an par e-mail (Listeria@pasteur.fr) (~10/semaine) et 500 appels téléphoniques/an (~10/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 (ex : alternative thérapeutique en cas d'allergie aux β -lactamines).

2/ Professionnels de l'alimentaire

- demandes de renseignements concernant l'envoi de souche et les alertes produits (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.

5/ Journaliste

- demande d'informations ;
- Possibilité de tournage.

Leur analyse permet 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, proposer et développer de nouveaux outils pour le diagnostic des cas de listériose et le typage moléculaire des souches).

4.4 EXPERTISES

Les responsables du CNRL peuvent être sollicités pour participer à des réunions nationales ou internationales 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 2011, le CNRL a reçu quelques 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 2.3.10.).

Le CNRL a également reçu 183 souches d'origine environnementale et/ou alimentaire, adressées par des laboratoires d'hygiène et de contrôle des aliments pour leur identification et leur caractérisation (cf. chapitre 3.2.).

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

En 2011, les responsables du CNRL ont contribué à la révision des normes françaises, européennes et internationales pour les *Listeria* en microbiologie de la chaîne alimentaire et à l'harmonisation européenne des méthodes de groupage PCR et de typage moléculaire des *L. monocytogenes*.

Expertise de publications et de projets scientifiques

En 2011, 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, Research in Microbiology, Journal of Food Protection, International Journal of Food Microbiology, Food Analytical Methods, Journal of Analytical Methods, International Journal of Systematic and evolutionary microbiology, etc. Dans ce cadre, environ 15 publications sur *L. monocytogenes* ont été examinées en 2011.

Expertises dans des comités nationaux, européens ou internationaux

Les responsables du CNRL ont participé comme membres de plusieurs instances en tant qu'experts ou conseillers (ECDC groupe *Listeria*, membre de PulseNet Europe (réseau Med-Vet-Net), 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 de la chaîne alimentaire 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'ANSES, etc.

Lors de plusieurs réunions à l'ANSES du CES Microbiologie, le sujet des *Listeria* a été abordé dans des dossiers et a été argumenté par le CNRL.

Conseil auprès de Ministère

De part sa participation à la cellule *Listeria* et sa participation au CES Microbiologie de l'ANSES pour l'évaluation du risque *Listeria*, le CNRL est en contact avec les services concernés des Ministères de l'Economie, de l'Agriculture et de la Santé.

4.5 RETOUR D'INFORMATIONS

Compte-rendu d'analyses

La surveillance microbiologique de la listériose en France se fonde sur l'envoi volontaire et centralisé au CNR des *Listeria* (Institut Pasteur) de 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 dans les plus brefs délais.

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*.

Depuis 2006, le CNRL participe annuellement à la réunion multidisciplinaire de chimiothérapie infectieuse (RICAI) sur les sujets en rapport avec son activité.

Depuis 2007, le rapport d'activité du CNRL est mis en ligne après validation par l'InVS sur notre site web (Adresse <http://www.pasteur.fr/ip/resource/filecenter/document/01s-000046-029/ip-rap2009-cnr-Listeria.pdf>) et adressé à tous les institutionnels investis dans la surveillance de la listériose ainsi qu'à toute personne en faisant la demande.

En 2011, le CNR a participé à l'élaboration de deux articles d'un Bulletin Epidémiologique hebdomadaire spécial sur les pathogènes alimentaires en collaboration avec l'InVS pour le bilan de la surveillance humaine de la listériose et avec l'ANSES (LNRI), la DGAI, la DGCCRF pour le bilan de la surveillance dans les aliments (Cf. Chapitre 5.1.1. et 5.1.2.). Ces articles sont en cours de révision. Ils permettront d'expliquer la surveillance nationale, son principe et ses résultats ainsi que son futur à un vaste public.

Le CNRL, A. leclercq, en 2011 a été nommé pour la rédaction de la fiche ANSES sur le danger *Listeria monocytogenes* pour le grand public et les exploitants agro-alimentaires, avec E. Pierron (IFIP) ainsi que R. Ruscassié (ANSES) et la relecture du CES Microbiologie de l'ANSES.

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

Le Groupe Microorganismes et barrières de l'hôte auquel le CNR des *Listeria* est affilié, participe aux 3 missions de l'Institut Pasteur : Expertise et Santé Publique, Enseignement et Recherche. Chaque année, l'Institut Pasteur attribue un budget propre de recherche et une affectation de ressources humaines et matérielles au CNRL et au CCOMS en complément de celui octroyé par l'InVS pour le CNRL. Ce budget permet notamment de développer des projets de recherche qui sont à l'interface entre les activités de surveillance du CNR et les activités de recherche fondamentale du groupe.

En 2011, le Groupe Microorganismes et barrières de l'hôte (MBH) a été évalué par l'AERES avec présentation de la synergie Groupe MBH - CNRL au comité AERES.

Les méthodes en développement ou les recherches déjà citées dans le chapitre 2.1.1. ne sont pas décrites dans ce chapitre.

5.1 CONTRIBUTIONS AUX ETUDES EPIDEMIOLOGIQUES

5.1.1 SYNTHÈSE SUR LA SURVEILLANCE DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* DANS LES ALIMENTS

Personnes impliquées au CNRL : A. Leclercq, V. Chenal-Francisque, M. Lecuit

Coordination par Anne Brisabois (ANSES)

En collaboration avec Sophie Roussel (ANSES), Julien Santolini (DGAI), Anselme Agbessi (DGCCRF), Renaud Lailler (ANSES), Nathalie Pihier (DGAI), Anne Brisabois (ANSES).

Article publié dans le BEH dans le cadre d'un numéro spécial sur les pathogènes alimentaires.

L'abstract est le suivant :

Listeria monocytogenes est une bactérie ubiquitaire largement répandue dans l'environnement, transmise à l'homme suite à l'ingestion d'aliments contaminés et à l'origine de cas rares mais graves chez l'Homme. Cette situation justifie la mise en place d'une surveillance de la bactérie dans les principales filières de transformation des produits carnés, laitiers, des produits de la mer et des produits végétaux. Ces filières constituent les principales sources de contamination des aliments notamment en production agro-alimentaire, soit à partir des matières premières, soit à partir de l'environnement où des souches peuvent devenir résidentes. Les plans nationaux de surveillance et de contrôle récents ont permis de cibler les filières de transformation les plus à risque. L'ensemble des mesures mises en place par l'industrie agro-alimentaire et les autorités, tant dans le domaine de la surveillance que de la gestion en cas de non-conformité, contribue à la maîtrise de la contamination et à la réduction de l'exposition des populations. De plus, les analyses de caractérisation des souches isolées des aliments permettent une surveillance moléculaire des populations de souches circulant dans ces filières, une possible identification de l'aliment contaminé et apportent également des

éléments complémentaires dans l'investigation épidémiologique des cas, et plus généralement dans l'évaluation du risque.

5.1.2 LISTERIOSE HUMAINE : SITUATION EN FRANCE ET EN EUROPE

Personnes impliquées au CNRL : A. Leclercq, V. Chenal-Francisque, M. Lecuit

Coordination par Véronique Goulet (InVS)

En collaboration avec Véronique Goulet, Edith Laurent, Lisa King, Véronique Vaillant, Marie-Jo Letort, Henriette de Valk (InVS)

Article publié dans le BEH dans le cadre d'un numéro spécial sur les pathogènes alimentaires. L'abstract est le suivant :

La listériose humaine est une maladie bactérienne qui se transmet par l'ingestion d'aliments contaminés. C'est une maladie à déclaration obligatoire. Le médecin de l'agence régionale de santé a pour mission d'interroger les patients sur leur consommation alimentaire et de transmettre les informations à l'InVS. Le centre national de référence des *Listeria* (CNRL) situé à l'Institut Pasteur, contribue à la surveillance en caractérisant et génotypant les souches envoyées par les laboratoires. Ce typage permet de détecter rapidement les cas infectés simultanément avec une souche du même génotype, et à l'InVS de rechercher une source alimentaire commune dans les interrogatoires des cas signalés par le CNRL. En cas de suspicion d'une source commune, les investigations complémentaires sont effectuées par la direction générale de l'alimentation et leurs services départementaux. Depuis 2001, six investigations ont permis d'identifier une source commune et d'éviter une situation épidémique préoccupante. Depuis 2006, l'incidence reste assez stable autour de 0,5 cas/ 100 000 d'habitants avec chaque année environ 300 cas, 50 décès et une douzaine de mort-fœtale ou de mort-nés. Les formes materno-néonatales représentent 15% des cas avec un ratio de 5 cas/100 000 naissances. L'incidence actuelle est proche de celle rapportée par la plupart des pays européens où l'on observe également une stabilité de l'incidence depuis 2007.

5.1.3 ENCEPHALITES A *LISTERIA MONOCYTOGENES* EN FRANCE

Personnes impliquées au CNRL : M. Lecuit, A. Leclercq

Coordination par Alexandra Mailles (InVS)

Article publié : Mailles, A., M. Lecuit, V. Goulet, A. Leclercq, and J. P. Stahl. 2012. Listeria monocytogenes encephalitis in France. Med Mal Infect 41:594-601.

Il s'agit de décrire les caractéristiques des patients atteints d'encéphalite listérienne inclus dans une étude nationale sur les encéphalites. *Listeria monocytogenes* était la quatrième plus fréquente cause d'encéphalite identifiée dans une étude prospective menée en France en 2007. Il est décrit 12 cas d'encéphalite listérienne (sept rhombocéphalites et cinq

encéphalites) et sont comparés aux patients atteints d'encéphalite d'autres origines étiologiques, et aux neurolistérioses notifiées durant la même année dans le cadre de la déclaration obligatoire. Les souches de *L. monocytogenes* des 12 patients appartenaient aux génotypes IVb ($n = 6$), IIa ($n = 3$) et IIb ($n = 3$). La protéinorachie médiane était de 2,5 g/L and la pléiocytose médiane de 367 cellules/mm³. Sept patients sur 12 présentaient des comorbidités. La létalité au cours de l'hospitalisation était de 50 %. Les patients à encéphalite listérienne inclus dans l'étude n'étaient pas différents de ceux recensés dans la déclaration obligatoire en termes de caractéristiques démographiques et de comorbidités. Ils étaient cependant significativement plus âgés et avaient plus fréquemment un cancer ou un traitement par corticostéroïdes que les patients de l'étude atteints d'une encéphalite d'une autre origine. En raison de son issue souvent défavorable, la neurolistériose doit être évoquée rapidement chez les patients atteints d'encéphalite pour en optimiser la prise en charge.

5.1.4 ETUDE DES FORMES MATERNO-FOETALES

Personnes impliquées au CNRL : C. Charlier-Woerther - B. Cazenave - A. Le Monnier - A. Leclercq – M. Lecuit

Collaboration avec l'InVS (V. Goulet)

*Poster C-16 présenté à la 12^{ème} journée nationale d'infectiologie. Toulouse. 8-10 Juin 2011. C. Charlier-Woerther, B. Cazenave, A. Leclercq, O. Lortholary, P. Ravaud, V. Goulet, M. Lecuit. *Listériose materno-néonatale : données sur les 26 premiers cas de l'étude MONALISA.**

En collaboration avec l'InVS, le CNRL a analysé les données épidémiologiques globales fournies par le CNRL et les réseaux de surveillance entre 1984 et 2006. L'analyse détaillée de 401 cas déclarés par le système de la DO entre 1999 et 2006 a permis de préciser les caractéristiques de ces infections.

L'incidence des cas de listériose MN a fortement diminuée entre 1984 (60 cas/100.000 naissances vivantes) et 2006 (3 cas/100.000 nv). La listériose MN peut toucher le couple mère-enfant à toute période de la grossesse et provoquer des infections néonatales (59%), des morts fœtales in utero (26,5%) et des infections maternelles isolées (14,5%). Les mortalités *in utero* et néonatales diminuent selon l'âge gestationnel.

L'étude rétrospective de 75 dossiers cliniques mère-enfant de listériose MN diagnostiquée en Ile-de-France entre 2000 et 2006 a permis de préciser les signes cliniques d'appel, la contribution des examens complémentaires dans le diagnostic de l'infection, la prise en charge thérapeutique. L'analyse des dossiers a mis en évidence que le défaut d'information des femmes ou le non suivi des grossesses constitue la principale cause de non suivi des recommandations des règles hygiéno-diététiques permettant la prévention de la listériose.

Par ailleurs, 52 dossiers cliniques (mère et nouveau-nés) correspondant à des cas d'infection materno-fœtale diagnostiqués en Ile-de-France entre 2000 et 2006, sont en cours d'analyse. Cette étude a permis non seulement de préciser les caractéristiques des infections chez la mère et les nouveau-nés et notamment d'évaluer l'impact des mesures de prévention.

Deux articles sur ces données sont en cours de rédaction.

5.1.5 OPTIMISATION DE LA SURVEILLANCE NATIONALE DE LA LISTERIOSE

*Personnes impliquées au CNRL : A. Leclercq, V. Chenal-Francisque, M. Lecuit
En collaboration avec Bruno Pot et Kathleen Vrancx (Applied Maths, Belgique)*

En novembre 2010, un bilan sur la surveillance nationale a été réalisé avec la cellule *Listeria* afin de trouver les pistes d'amélioration continue et d'allègement du système. Les principales décisions ont été appliquées en 2011.

L'une des innovations proposée par le CNRL est outre de baser le déclenchement de signalements ou de suivre des alertes sur des cas humains d'intégrer la rareté ou l'endémicité des pulsotypes des souches de ces événements. Cette fréquence sera intégrée dans les prochains tableaux de surveillance de 2013. Le CNRL a imaginé deux outils de suivi des profils PFGE pour détecter des phénomènes anormaux sur des profils rares ou essayer d'avoir un système d'alertes comme pour la surveillance des *Salmonella* en cas d'augmentation d'un clone dit épidémique ou majeur.

5.1.6 PUBLICATIONS DE CAS CLINIQUES FRANÇAIS EN PARTENARIAT AVEC DES LABORATOIRES CORRESPONDANTS

5.1.6.1 CAS GROUPES DE LISTERIOSES NEUROMENINGEES EN TOURAINE

*Personnes impliquées au CNRL : A. Leclercq, M. Lecuit
En collaboration avec H. Chaussade (CHU Bretonneau, tours)
Article publié. Chaussade, H., D. Garot, F. Bastides, C. De Gialluly, E. Mercier, G. Gras, A. Leclercq, and D. Perrotin. 2011. A Touraine cluster of central nervous system listeriosis. *Med Mal Infect* 41:613-6.*

Quatre cas d'infections neuro-méningées à *L. monocytogenes* survenus en Touraine entre mai 2009 et mars 2010 sont décrits. Lors de l'interrogatoire des patientes et de leur entourage, la DDASS a identifié une même source de contamination, à savoir du fromage de chèvre au lait cru provenant du même producteur, et a alerté les services vétérinaires qui ont procédé à un contrôle. Des souches de *L. monocytogenes* isolées chez ce producteur ont été transmises au Centre national de référence des *Listeria* (CNRL), qui a comparé les souches isolées chez les quatre cas avec celles prélevées chez ce producteur. Le CNRL a établi que toutes ces souches avaient les mêmes caractéristiques microbiologiques (même génosérotype IVb et profils

similaires de macrorestriction d'ADN au moyen des enzymes *Ascl/Apal*) et a confirmé la suspicion de source commune entre les cas.

5.1.6.2 ABCES CEREBRAL A *LISTERIA MONOCYTOGENES* DE LOCALISATION INHABITUELLE

Personnes impliquées au CNRL : A. Leclercq, M. Lecuit

En collaboration avec C. de Champs (CHU Robert-Debre, Reims)

*Articlé publié Coste, J. F., V. Duval, Y. Nguyen, T. Guillard, L. Brasme, C. David, C. Strady, M. Lecuit, and C. de Champs. 2011. Unusual location of a brain abscess due to *Listeria monocytogenes*. *Pathol Biol (Paris)*.*

Un cas d'abcès cérébral à *Listeria monocytogenes* de localisation sus-tentorielle est décrit. Les hémocultures et le dosage de la procalcitonine sanguine étaient négatifs. Le diagnostic a pu être posé grâce à l'isolement de *L. monocytogenes* dans le LCR après inoculation en milieu liquide Castañeda.

5.1.6.3 *LISTERIA MONOCYTOGENES* : UNE COMPLICATION RARE DE DERIVATION VENTRICULO PERITONEALE CHEZ DES ENFANTS

Personnes impliquées au CNRL : A. Le Monnier

En collaboration avec l'Hopital Necker-Enfants Malades

*Articlé publié Le Monnier, A., S. Blanot, E. Abachin, J. L. Beretti, P. Berche, and S. Kayal. *Listeria monocytogenes*: a rare complication of ventriculoperitoneal shunt in children. *J Clin Microbiol* 49:3924-7.*

Un cas d'infection sur dérivation ventriculo-péritonéale d'un garçon de 3 ans causé par *L. monocytogenes* ultérieur à une péritonite aiguë. Cette présentation inhabituelle d'une listériose neuroméningée souligne la capacité de ces bactéries pour former et subsister en biofilms sur des dispositifs médicaux.

5.2 METHODES DE DIAGNOSTIC ET ATYPIES DES SOUCHES

5.2.1 PROFIL ATYPIQUE DE SEROGRUPE PCR DE *L. MONOCYTOGENES*

Personnes impliquées au CNRL : H. Dieye - V. Chenal-Francisque - A. Leclercq

*Article publié : Leclercq, A., V. Chenal-Francisque, H. Dieye, T. Cantinelli, R. Drali, S. Brisse, and M. Lecuit. Characterization of the novel *Listeria monocytogenes* PCR serogrouping profile IVb-v1. *Int J Food Microbiol* 147:74-7.*

En 2006 et 2007, trois profils atypiques de sérogrupe PCR ont été observés chez des souches de *Listeria monocytogenes* appartenant au sérovar 4b. Le CNRL a caractérisé phylogénétiquement ces souches ainsi que d'autres souches de ses collections avec ce profil atypique et a amendé par publication son schéma de groupage PCR en décrivant un nouveau profil IVb-v1 pour les souches du groupe PCR IVb. Cette étude a servi à une investigation en Allemagne où des souches avec ce profil atypique ont été en 2010 à l'origine de cas groupés.

5.2.2 ETUDE DE SOUCHES HYPOVIRULENTES ET AVIRULENTES

*Personnes impliquées au CNRL : M. Ragon – A. Le Monnier - A. Leclercq - M. Lecuit
Coordination de S. ROCHE (INRA)*

*Article soumis à *Applied Environmental Microbiology*. Roche S. M., O. Grépinet, S. Brisse, A. Kerouanton, M. Ragon, A. Leclercq, S. Témoin, B. Schaeffer, G. Skorski, L. Mereghetti, A. Le Monnier, P. Velge: Evolutionary origins of low-virulence field *Listeria monocytogenes*.*

Dans le cadre d'un projet avec l'INRA UR 918 Pathologie infectieuse et Immunologie de Tours, plusieurs souches avirulentes ou hypovirulentes ont été détectées dans un modèle de formation de plage de lyse et d'inoculation à la souris. La caractérisation de ces souches inclut leur typage moléculaire (groupe PCR, pulsotype, etc.) et le séquençage des gènes codant les principaux facteurs de virulence (LLO, ActA, InlA, PlcB, etc.). Par ailleurs, le CNRL a inclus ces souches dans sa base de données MLST afin de pouvoir analyser les processus évolutifs ayant conduit à l'émergence de ces souches en les comparant aux souches virulentes de *L. monocytogenes* isolées de cas de listériose.

5.3 TAXONOMIE, NOUVELLES ESPECES DE *LISTERIA*

En tant que CNR et CCOMS des *Listeria*, la taxonomie du genre *Listeria* et leur impact en termes de santé publique doit être actualisée pour détecter toute évolution de souches.

5.4 DEVELOPPEMENT DE NOUVEAUX OUTILS DE DIAGNOSTIC

5.4.1 UTILISATION DU GENE *IAP* POUR L'IDENTIFICATION DES *LISTERIA*

Collaboration avec F. HMAIED du Laboratoire de Microbiologie et Biologie Moléculaire de Shidi Thabet, Tunisie

*Article en cours de soumission. Hmaied Fatma, Helel Salma, Véronique Le berre, JeanMarie François, Alexandre Leclercq, Marc Lecuit, H. Smaoui, Amel Kechrid, Mouldi Saidi, Boudabous Abdellatif and Barkallah Insaf. Prevalence, identification by a DNA microarray-based assay and characterization of *Listeria* spp. isolated in foods on the markets of Tunis (Tunisia)*

Le CNRL a participé à l'identification et l'étude de souches tunisiennes au moyen de puces à ADN comportant des sondes pour le gène *iap* (invasion associated protein) codant pour la protéine p60 qui est exprimée en surface de la bactérie. La différence dans la séquence du gène *iap* permet d'identifier avec précision l'espèce au sein du genre *Listeria* et principalement *monocytogenes* ce qui en fait une méthode alternative d'identification.

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

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

*Personnes impliquées au CNRL : V. Chenal Francisque – T. Cantinelli - A. Leclercq - M. Lecuit
En collaboration avec la plate-forme de génotypage des pathogènes et santé publique PF8 (S. Brisse & V. Caro)*

*Article publié : Chenal-Francisque, V., J. Lopez, T. Cantinelli, V. Caro, C. Tran, A. Leclercq, M. Lecuit, and S. Brisse. 2012. Worldwide distribution of major clones of *Listeria monocytogenes*. *Emerg Infect Dis* 17:1110-2.*

Le Multilocus Sequence Typing (MLST) combine un pouvoir discriminant élevé pour de nombreuses espèces microbiennes et génère des données standardisées qui sont utiles pour l'étude de la phylogénie des souches et de leur évolution. Nous avons construit une base de données MLST pour 7 gènes de ménage (*abcZ*, *blgA*, *cat*, *dapE*, *dat*, *ldh*, *lhkA*) à partir d'une sélection de 178 souches non reliées épidémiologiquement provenant du CNRL et du CCOMS des *Listeria*.

La MLST procure des informations cruciales quant aux relations phylogénétiques entre les souches, alors que les données de PFGE ne donnent pas d'information phylogénétique et les

souches appartenant à des complexes clonaux uniques ne sont d'ailleurs pas nécessairement regroupées sur la base de la PFGE.

L'ensemble des données rassemblées a également permis de constituer la première base de données de *Multilocus Sequence Typing* (MLST) ouverte et accessible en ligne à la communauté scientifique <http://www2.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/> afin de favoriser les échanges et les collaborations internationales sur l'étude de la structure génétique des populations de *Listeria*. Plusieurs groupes (USA, Europe) utilisent cette base de données et de nouveaux travaux collaboratifs dans le domaine de l'étude de la structure génétique des populations de *Listeria* sont en cours.

En 2009 et 2010, les résultats de typage par MLST sur des souches françaises ont été comparés à ceux de la MLST sur 300 souches mondiales provenant du soucier du CCOMS des *Listeria*. Les résultats obtenus montrent un profil de diversité similaire à celui qui avait été initialement décrit en France. En effet, la structure des populations de ces souches mondiales est similaire à celle obtenues pour les souches françaises. *L. monocytogenes* semble donc montrer une diversité clonale homogène, indiquant un taux élevé de dispersion à l'échelle mondiale.

En 2010, le CNRL a complété son schéma MLST en y adjoignant des gènes de virulence pour obtenir un schéma de MvLST.

Le CNR a présenté à l'ECDC et au réseau européen des LNR *Listeria monocytogenes* la MLST comme outil d'étude de circulation de souches et d'identification rapide des complexes clonaux à l'origine des épidémies.

5.5.2 ETUDE DE LA RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES

Personnes impliquées au CNRL : A. Morvan – A. Leclercq – M. Lecuit

En collaboration avec le CNR de la résistance aux antibiotiques (P. Courvalin)

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

Outre son suivi quotidien des souches d'origine humaine et de leurs tendances en termes de résistance aux antibiotiques, le CNRL étudie sur le plan génétique une souche résistante à la rifampicine afin d'en comprendre le mécanisme.

5.6 INVESTIGATION DES INFECTIONS OSTEO-ARTICULAIRES ET DE FORMES ATYPIQUES DE LISTERIOSE

Personnes impliquées au CNRL : C. Charlier - A. Leclercq - M. Lecuit

*Article publié : Charlier, C., A. Leclercq, B. Cazenave, N. Desplaces, L. Travier, T. Cantinelli, O. Lortholary, V. Goulet, A. Le Monnier, and M. Lecuit. *Listeria monocytogenes-associated joint and bone infections: a study of 43 consecutive cases. Clin Infect Dis 54:240-8.**

Il existe peu de connaissances sur la listériose liée à des infections osseuses associées à *L. monocytogenes* sauf des rapports de cas. Une étude rétrospective de cas osseux et des articulations prouvés par la culture rapportés au Centre national de Référence français pour Listériose de 1992 à 2010 a été effectuée. Quarante-trois patients ont été étudiés : 61 % étaient des hommes et l'âge médian était de 72 ans (16-89); 24 patients montraient des comorbidités (56 %). Trente-six patients (84 %) avaient des dispositifs d'implant orthopédiques : articulations prothétiques (n = 34) ou fixation interne (n = 2); le temps médian après l'insertion était 9 ans (0.1-22). L'infection subaiguë était plus fréquente (la médiane, 4 semaines [2-100], 74 %) que l'infection aiguë (< 7 jours, 23 %), avec des caractéristiques cliniques non spécifiques; 45 % des patients n'avaient aucune fièvre. Les cultures de sang étaient positives dans 3 des 19 cas. Le génotypage des isolats a révélé 4 modèles : IVb (21 de 42, 50 %), IIa (17 de 42, 40 %), IIb (2 de 42, 5 %) et IIC (2 de 42, 5 %). Cinq groupes de souches avec des pulsotypes semblables ont été identifiés sans liaison épidémiologique. Les antibiotiques, principalement l'amoxicilline (80 %) avec aminoglycosides (48 %), ont été prescrits pour une durée médiane de 15 semaines (2-88). Dix-huit patients (50 %) ont subi un remplacement de prothèse; tous avec succès après le suivi médian de 10 mois (la gamme, 1-75). Parmi ces 5, 3 ont subi dans un deuxième temps un remplacement prothétique ne permettant une guérison de l'infection avec un recul de 1 an ou plus. La listériose osteo articulaire implique principalement des articulations prothétiques et survient en majorité chez des patients âgés et immunodéprimés. Un traitement médico chirurgical avec changement de matériel prothétique semble requis pour assurer une guérison clinique.

6 LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

6.1 PUBLICATIONS NATIONALES

- **Mailles, A., M. Lecuit, V. Goulet, A. Leclercq, and J. P. Stahl.** 2011. *Listeria monocytogenes* encephalitis in France. *Med Mal Infect* **41**:594-601.
- **Chaussade, H., D. Garot, F. Bastides, C. De Gialluly, E. Mercier, G. Gras, A. Leclercq, and D. Perrotin.** 2011. [A Touraine cluster of central nervous system listeriosis]. *Med Mal Infect* **41**:613-6.
- **Coste, J. F., V. Duval, Y. Nguyen, T. Guillard, L. Brasme, C. David, C. Strady, M. Lecuit, and C. de Champs.** 2011. Unusual location of a brain abscess due to *Listeria monocytogenes*. *Pathol Biol (Paris)*.
- **Leclercq A, Pierron, E., Ruscassie, R., et le CES Microbiologie de l'ANSES.** Fiche de danger : *Listeria monocytogenes*. Approuvée par l'Anses, mis en ligne en 2012 sur le site ANSES.
- **Charlier-Woerther, C., et Lecuit M.** 2011. Infections de la mère et de l'enfant. La lettre de l'Internat.

6.2 PUBLICATIONS INTERNATIONALES

- **Chenal-Francisque, V. J. Lopez, T. Cantinelli, V. Caro, C. Tran, A. Leclercq, M. Lecuit, and S. Brisse.** 2011. Worldwide distribution of major clones of *Listeria monocytogenes*. *Emerg Infect Dis* **17**:1110-2.
- **Charlier, C., A. Leclercq, B. Cazenave, N. Desplaces, L. Travier, T. Cantinelli, O. Lortholary, V. Goulet, A. Le Monnier, and M. Lecuit.** 2012. *Listeria monocytogenes*-associated joint and bone infections: a study of 43 consecutive cases. *Clin Infect Dis* **54**:240-8.
- **Hein, I., S. Klinger, M. Dooms, G. Flekna, B. Stessl, A. Leclercq, C. Hill, F. Allerberger, and M. Wagner.** 2011. Stress survival islet 1 (SSI-1) survey in *Listeria monocytogenes* reveals an insert common to *Listeria innocua* in sequence type 121 *L. monocytogenes* strains. *Appl Environ Microbiol* **77**:2169-73.
- **Lombard B, and A. Leclercq.** 2011. Validation of innovative food microbiological methods according to the EN ISO 16140 standard. *Food Analytical Methods*. **4**(2): 163-172.

- **Laciar, A. L., M. L. Vaca Ruiz, and A. Le Monnier.** Neonatal *Listeria*-meningitis in San Luis, Argentina: a three-case report. *Rev Argent Microbiol* **43**:45-7.
- **Leclercq, A., V. Chenal-Francisque, H. Dieye, T. Cantinelli, R. Drali, S. Brisse, and M. Lecuit.** 2011. Characterization of the novel *Listeria monocytogenes* PCR serogrouping profile IVb-v1. *Int J Food Microbiol* **147**:74-7.
- **Le Monnier, A., S. Blanot, E. Abachin, J. L. Beretti, P. Berche, and S. Kayal.** *Listeria monocytogenes*: a rare complication of ventriculoperitoneal shunt in children. *J Clin Microbiol* **49**:3924-7.
- **Le Monnier, A., E. Abachin, J. L. Beretti, P. Berche, and S. Kayal.** Diagnosis of *Listeria monocytogenes* meningoencephalitis by real-time PCR for the hly gene. *J Clin Microbiol* **49**:3917-23.
- **Nikitas G, Deschamps C, Disson O, Niaux T, Cossart P, Lecuit M.** 2011. Transcytosis of *Listeria monocytogenes* across the intestinal barrier upon specific targeting of goblet cell accessible E-cadherin. *J. Exp. Med.* **208**(11):2263-77.

6.3 COMMUNICATIONS NATIONALES

- **Journée Départementale du Département Infections et Epidémiologie.** Institut Pasteur, Paris. 6 Janvier 2011. Poster. Viviane Chenal-Francisque, Jodie Lopez, Thomas Cantinelli, Valerie Caro, Coralie Tran, Alexandre Leclercq, Marc Lecuit, and Sylvain Brisse. "Molecular typing of *Listeria monocytogenes*: a public health and population biology perspective". Abstract P24 page 48.
- **Journée « La PCR dans tous ses états Agro-alimentaire – Environnement - Santé humaine et animale ».** ASFILAB (Association des responsables de la qualité et de la fiabilité analytique). Paris. 18 Octobre 2011. Communication orale – A. Leclercq. Frontières des méthodes PCR en microbiologie des aliments et des eaux.
- **12ème journée nationale d'infectiologie.** Toulouse. 8-10 Juin 2011. C. Charlier-Woerther, B. Cazenave, A. Leclercq, O. Lortholary, P. Ravaud, V. Goulet, M. Lecuit. Listériose materno-néonatale : données sur les 26 premiers cas de l'étude MONALISA. Poster C-16.

6.4 COMMUNICATIONS INTERNATIONALES

- **5th Workshops of the NRLs for *Listeria monocytogenes*.** 10-11 Mars 2011. Paris. Marc Lecuit et Sylvain Brisse. « Recent trends in human Listeriosis ».

6.5 CONFERENCES SUR INVITATIONS

- **Séminaire du Centre pour l'Infection & Immunologie de Lille.** 11 Octobre 2011. Lille. Marc Lecuit. « *Listeria monocytogenes*, a silent invader ».
- **GABBA Module in Microbiology and Infection.** 19 Janvier 2011. Porto, Portugal. Marc Lecuit. Microbes and host barriers.
- ***Listeria monocytogenes*, an expert barrier breaker.** 17 Janvier 2011. Department of Infectious Diseases and Pathobiology seminar series, University of Bern, Switzerland. Marc Lecuit.
- **FDA/USDA/CDC sponsored *Listeria monocytogenes* dose-response Workshop Pathophysiology of listeriosis.** 17-18 Mars 2011. Arlington, USA. Marc Lecuit.
- **International workshop on Intestinal mucosal homeostasis and disease.** 23-24 Mars 2011. Hannover, Germany. Marc Lecuit. *Listeria monocytogenes*, a silent invader.
- **Symposium "The intestine, a cell signaling paradigm".** *Listeria monocytogenes* breaching of the intestinal epithelium. Marc Lecuit. 25 Mars 2011. Collège de France, Paris, France.
- **Department of Microbiology seminar series.** Peking University, Beijing, China. 6 Avril 2011. Marc Lecuit. *Listeria monocytogenes* crossing of host barriers.
- **2nd Conference on "Microbiology: Pathogens and Host Response"** *Listeria monocytogenes*, a silent invader. Marc Lecuit. Hebrew University of Jerusalem, Israel. 10-13 Mai 2011.
- **1st Eranet pathogenomics Listress meeting.** Giessen, Germany. 27 Mai 2011. Marc Lecuit. Animal models for gastrointestinal listeriosis.
- **Seminar series, Departments of Environmental health science, Infectious diseases, Microbiology and the Biomedical Health Science Institute,** University of Georgia, Athens, GA, USA. 20 Juin 2011. Marc Lecuit. *Listeria monocytogenes* crossing of host barriers.
- **Seminar series, Division of biological and biomedical sciences.** Emory University, Atlanta, USA. 22 Juin 2011. Marc Lecuit. *Listeria monocytogenes* crossing of host barriers.
- **Microbial Pathogenesis & Host Response, Cold Spring Harbour Meeting, Cold Spring Harbour, NY, USA.** 15 Septembre 2011. Marc Lecuit. Transcytosis of *Listeria monocytogenes* across the intestinal barrier upon specific targeting of goblet cell accessible E-cadherin.

- **Seminar series.** *Listeria monocytogenes*, a silent invader. Institut Pasteur de Lille, Lille. 11 Octobre 2011. Marc Lecuit.
- **Systems biology and genomic medicine Todai Symposium. Infection and Immunity: beyond the future in the control of infectious disease.** 18 Octobre 2011. Institut Pasteur, Paris, France. Marc Lecuit. Transcytosis of *Listeria monocytogenes* across the intestinal barrier upon specific targeting of goblet cell accessible E-cadherin.
- **Seminar series.** *Listeria monocytogenes* crossing of host barriers. Centre de Physiopathologie de Toulouse-Purpan, Toulouse, France. 23 Novembre 2011. Marc Lecuit.

CONCLUSIONS GENERALES

En 2011, le nombre de cas de listériose déclarés en France a été de 283 cas (-9% par rapport à 2010). Cette légère diminution concerne notamment les formes materno-néonatales et neuroméningées. Ce chiffre reste élevé, relativement stable depuis 2007, année qui s'inscrivait en nette augmentation par rapport aux années 1995-2005. Une situation similaire est observée dans d'autres pays européens. L'augmentation constatée depuis 2007 n'a pas de cause identifiée à ce jour. Le taux de létalité 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. En 2011, une TIAC à *Listeria monocytogenes* a été investiguée, il s'agit d'un phénomène inhabituel et donc à surveiller. Le CNRL a participé à la diffusion au grand public et aux professionnels des informations sur *Listeria monocytogenes* en participant activement à l'établissement de la fiche de danger sur cette bactérie qui sera mise en ligne par l'ANSES. Le CNRL a été sollicité par les autorités sanitaires françaises pour la gestion d'alertes sur des produits contaminés en France et dans le cadre d'une épidémie en Belgique dont l'investigation a été facilitée par les données du système de surveillance français. Sur décision de la cellule *Listeria* fin 2010, une optimisation de la surveillance nationale a été mise en place en 2011 en simplifiant les tableaux hebdomadaires de surveillance.

Le CNR des *Listeria* participe à l'amélioration du diagnostic de listériose, à la détection des cas groupés et à l'identification de la source de contamination, en lien avec l'InVS et les autres partenaires de la cellule *Listeria*. Le CNRL a ainsi participé à l'évaluation de la spectrométrie de masse (MALDI-TOF) pour l'identification des bactéries à Gram positif et d'une nouvelle PCR en temps réel pour la détection de *L. monocytogenes* sur le LCR pour leurs utilisations potentielles par les LABM français.

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 validé un schéma de caractérisation des souches selon la méthode MLVA (Multi Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis). Il a également finalisé son étude phylogénétique par Multilocus Sequence Typing (MLST) à partir de souches originaires des 5 continents, afin d'étudier de façon la plus exhaustive la biodiversité et l'évolution de l'espèce *Listeria monocytogenes*. Il a démontré que les clones majeurs avaient une distribution ubiquitaire. Cette méthode est aujourd'hui utilisée par d'autres laboratoires de référence européens et dans le monde.

Afin de mieux caractériser les formes cliniques de la listériose, préciser les modalités diagnostiques et thérapeutiques et identifier des facteurs de risque et pronostiques, le CNRL participe à l'étude prospective cas-témoins MONALISA (clinical trials NCT01520597). Financée principalement par le programme hospitalier de recherche clinique national (PHRC), elle permettra d'avancer dans la compréhension de cette infection sévère. Le CNRL a également publié la première série de listériose ostéo-articulaire, forme rare de cette infection.

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. Dans le cadre de collaborations, 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 2010a. Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. SOUSSY C.J. (ed.). SFM, 2010, Paris.
- Anonyme. REMIC: Référentiel en microbiologie médicale (bactériologie et mycologie). SFM, 4^{ème} édition, 2010, 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., Moysse C., Dehaumont P., Salvat G., Veit P. Listeriosis outbreak associated with the consumption of rillettes in France in 1993. J. Infect. Dis., 1998, 177, 155-160.

Goulet, V., C. Jacquet, P. Martin, V. Vaillant, E. Laurent and H. de Valk. "Surveillance of human listeriosis in France, 2001-2003." Euro Surveill, 2006, 11(6): 79-81.

Goulet, V., Hedberg C., Le Monnier A., et H. de Valk. Listeriosis in France in a context of increasing incidence in European countries. Emerg Infect Dis. 2008 May;14(5):734-40.

Goulet, V., Leclercq, A., Vaillant, V., Le Monnier, A., Laurent, E., Thierry-Bled, F., Pihier, N., et H. de Valk. Recrudescence récente des cas de listériose en France. Bull. Epidemiol. Hebdom., 2008, 268-272.

Graves L., Hunter S., Tucker N., Brett M., Harvey J., Jacquet CH., Kerouanton-Legall A., Lehnkering E., Ojeniyi B., Wagner M., Brisabois A., Gilmour A., Rocourt J., Swaminathan B. Status report on WHO-sponsored international collaborative study of subtyping methods for *Listeria monocytogenes* : pulsed-field gel electrophoresis, phase III. Proceedings of the XIV International Symposium on Problems of Listeriosis, Mannheim, 13-16 mai 2001, 149.

Graves L.M., et B. Swaminathan. PulseNet standardized protocol for subtyping *Listeria monocytogenes* by macrorestriction and pulsed-field gel electrophoresis. Int. J. Food Microbiol., 2001, 65, 55-62.

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

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., Miegéville 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, XXXII, 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, XXXIII, 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., Majjala 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 phagovar 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., Miegville 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., Salmasso S. A foodborne outbreak of gastroenteritis involving *Listeria monocytogenes*. Epidemiol. Infect., 1996, 117, 429-436.
- Schlecht W.F., Lavigne P.M., Bortolussi R.A., Allen A.C., Haldane E.V., Worth A.J., Hightower W., Johnson S.E., King S.H., Nicolls E.S., Broome C.V. Epidemic listeriosis - Evidence for transmission by food. New Engl. J. Med., 1983, 308, 203-206.
- Schönberg, A.; Bannerman, E.; Courtieu, A. L.; Kiss, R.; McLauchlin, J.; Shah, S., and Wilhelms, D. Serotyping of 80 strains from the WHO multicentre international typing study of *Listeria monocytogenes*. Int. J. Food Microbiol., 1996, 32, 279-287.
- Schuchat A., Lizano C., Broome C.V., Swaminathan B., Kim C., Winn K. Outbreak of neonatal listeriosis associated with mineral oil. Pediat. Infect. Dis. J., 1991, 10, 183-189.
- Schwartz B., Hexter D., Broome C.V., Hightower A.W., Hirschhorn R.B., Porter J.D., Hayes P.S., Bibb W.F., Lorber B., Faris D. G. Investigation of an outbreak of listeriosis : new hypotheses for the etiology of epidemic *Listeria monocytogenes* infections. J. Infect. Dis., 1989, 159, 680-685.
- Scotti, M., L. Lacharme-Lora, M. Wagner, I. Chico-Calero, P. Losito, and J. A. Vazquez-Boland. 2006. Coexpression of virulence and fosfomycin susceptibility in *Listeria*: molecular basis of an antimicrobial in vitro-in vivo paradox. Nat Med 12:515-7.
- Seeliger H.P.R., Höhne K. Serotyping of *Listeria monocytogenes* and related species. In : Methods in Microbiology, Bergan, T. and Norris, J., ed., 1979; Academic Press, New York, 33-48.
- Seeliger H.P.R., Rocourt J., Schrettenbrunner A., Grimont P.A.D., Jones D. *Listeria ivanovii* sp. nov. Int. J. System. Bacteriol., 1984, 34, 336-337.
- Sethi S.K., Ghafoor M.A., Vandepitte J. Outbreak of neonatal listeriosis in a regional hospital in Kuwait. Eur. J. Pediat., 1989, 148, 368-70.
- Sperry K.E., Kathariou S., Edwards J.S., Wolf L.A. Multile-Locus Number Tandem Repeat Analysis as a subtyping tool for *Listeria monocytogenes*. J. Clin. Microbiol. (Sous presse)
- Stamm A.M., Dismukes W.E., Simmons B.P., Cobbs C.G., Elliott A., Budrich P., Harmon J. Listeriosis in renal transplant recipients : report of an outbreak and review of 102 cases. Rev. Infect. Dis., 1982, 4, 665-682.
- Swaminathan, B.; Hunter, S. B.; DeSmarchelier, P. M.; Gerner-Smidt, P.; Graves, L. M.; Harlander, S.; Hubner, R.; Jacquet, Ch.; Pedersen, B.; Reineccius, K.; Ridley, A.; Saunders, N. A., and Webster, J. A. WHO-sponsored international collaborative study to evaluate methods for subtyping *Listeria monocytogenes*: restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis using ribotyping and Southern hybridization with two probes derived from *L. monocytogenes* chromosome. Int. J. Food Microbiol., 1996, 32, 263-278.
- Veit P. Investigations des administrations de contrôle pour rechercher l'origine alimentaire de deux épidémies de listériose survenues en France en 1992 et 1993. Méd. Mal. Infect., 1995, 25, 191-193.
- Wernars, K.; Boerlin, P.; Audurier, A.; Russell, E. G.; Curtis, G. D. W.; Herman, L., and van der Mee-Marquet, N. The WHO multicentre study on *Listeria monocytogenes* subtyping: random amplification of polymorphic DNA (RAPD). Int. J. Food Microbiol., 1996, 32, 325-341.