



DATE : Avril 2013

RESPONSABLE :	M. LECUIT
RESPONSABLE ADJOINT :	A. LECLERCQ
INGENIEUR :	V. CHENAL-FRANCISQUE
MEDECIN CHERCHEUR :	C. CHARLIER-WOERTHER
TECHNICIENS :	T. CANTINELLI
	H. DIEYE
	A. MORVAN
SECRETAIRE :	M. BELIN



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. 2013. Rapport annuel d'activité du Centre national de Référence des Listeria – Année 2012. 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 2012 de souches et de renseignements permettant de remplir sa mission de surveillance microbiologique de la listériose en France et d'établir ce rapport.

TABLE DES MATIERES

RESUME.....	9
1 INTRODUCTION	10
2 ACTIVITES DE SURVEILLANCE	14
2.1 Surveillance de la listériose humaine en France	14
2.1.1 Surveillance microbiologique de la listériose en France.....	16
2.1.2 Surveillance et Dépassement de seuil (signalement)	17
2.1.3 Phase de surveillance renforcée	19
2.1.4 Phase d’Alerte	19
2.1.5 Surveillance de la résistance aux antibiotiques.....	20
2.1.6 Détection et analyse des infections nosocomiales.....	21
2.2 Contribution ou collaboration aux instances et systèmes de surveillance nationaux, européens et internationaux	22
2.2.1 InVS	22
2.2.2 ANSES et LNR <i>Listeria monocytogenes</i>	22
2.2.3 DGS – DGAL –DGCCRF	23
2.2.4 Laboratoire de Référence des <i>Listeria monocytogenes</i> de l’Union Européenne.....	23
2.2.5 European Center for Diseases Control: ECDC	24
2.2.6 Center for Diseases Control (CDC, USA)	25
2.2.7 EC Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF)	25
2.2.8 Centre Collaborateur OMS (CCOMS).....	26
2.3 Contribution ou collaboration a des projets de recherche clinique ou a des cohortes.	27
2.3.1 Cohorte nationale Observationnelle des Méningites Bactériennes communautaires de l’Adulte (COMBAT)	27
2.4 Données de la surveillance microbiologique de la listériose humaine	27
2.4.1 Cas de listériose en France.....	27

2.4.1.1	Définition de cas	27
2.4.2	Analyse globale des cas de listériose	28
2.4.3	Cas de listériose en France métropolitaine	32
2.4.3.1	Distribution temporelle des cas	33
2.4.3.2	Distribution des cas selon la forme clinique	37
2.4.3.3	Distribution des souches selon le groupe PCR	46
2.4.4	Cas de listériose dans les DROM-TOM	51
2.4.5	Etude de la résistance aux antibiotiques	52
2.4.6	Typage moléculaire des souches par macrorestriction d'ADN	53
2.5	Caractérisation des souches d'origine non humaine	57
2.5.1	Analyse générale	58
2.5.2	Souches isolées d'aliments	61
2.5.2.1	Catégories de laboratoires ayant adressé les souches.....	61
2.5.2.2	Nombre de souches et distribution par espèce	62
2.5.2.3	Distribution des souches de <i>L. monocytogenes</i> par catégorie d'aliments.....	63
2.5.2.4	Distribution des souches de <i>L. monocytogenes</i> par groupe PCR.....	63
2.5.2.5	Distribution des souches de <i>L. monocytogenes</i> par profils de macrorestriction	65
2.5.3	Souches isolées de l'environnement.....	66
2.6	Bilan des investigations, dépassements de seuil et alertes	68
2.6.1	Suspensions d'infections nosocomiales	68
2.6.2	Investigation a la demande de CIRE.....	68
2.6.3	Etablissement de données microbiologiques dans le cadre d'une requision et d'une demande d'un tribunal	69
2.6.4	Investigation d'un cas groupé ou epidemie	69
2.6.5	Dépassements de seuils.....	70
2.6.6	Alertes Produits DGAL	71
2.6.7	Alertes Produits DGCCRF	73
2.6.8	Alerte Européenne RASFF.....	73
2.6.9	Cooperation des systemes de surveillance	73

2.6.9.1	France-belgique dans le cadre d'une épidémie belge	73
2.6.9.2	France-Allemagne	73
2.6.9.3	France-Finlande	74
2.6.9.4	France-USA	74
2.6.10	Dispositif de veille et de surveillance dédié aux jeux olympiques	74
2.6.11	Enquête des formes neuroméningées et autres formes	75
2.6.12	Conclusions	76
3	ACTIVITES D'INFORMATION, DE FORMATION ET DE CONSEIL	77
3.1	Site Internet	77
3.2	Cours et conférences sur invitation	77
3.3	Formation et encadrement.....	78
3.3.1	Demande d'informations et de conseils	78
3.4	Expertises	79
3.5	Retour d'informations	80
4	TRAVAUX DE RECHERCHE EN LIEN DIRECT AVEC L'ACTIVITE DU CNRL.....	82
4.1	Contributions aux études épidémiologiques	82
4.1.1	Synthèse sur la surveillance de <i>Listeria monocytogenes</i> dans les aliments.....	82
4.1.2	Listériose humaine : situation en France et en Europe.....	83
4.1.3	Synthèse sur la contamination des produits de la mer et impacte en santé publique.....	83
4.1.4	Etude de la contamination du beurre et impact en santé publique	84
4.1.5	Coopération du système de surveillance français et belge et utilisation de la plateforme EPIS dans le cadre de la gestion d'une épidémie belge	85
4.1.6	Optimisation de la surveillance nationale de la listériose	85
4.1.7	Publications de cas cliniques français en partenariat avec des laboratoires correspondants.....	86
4.1.7.1	Transmission nosocomiale probable de listériose chez des nouveaux-nés.....	86
4.1.7.2	Traitement de la listériose pendant la grossesse : les leçons de 4 cas.....	86
4.2	Méthodes de diagnostic et atypies des souches	86
4.2.1	Caractérisation de <i>Listeria monocytogenes</i> par Maldi-Tof	86

4.2.2	Souches de <i>Listeria monocytogenes</i> non hémolytiques	87
4.2.3	Développement d'une méthode de référence d'isolement de <i>L. monocytogenes</i> dans les selles et études de gastroenterites à <i>L. monocytogenes</i>	87
4.2.4	Evaluation des <i>L. monocytogenes</i> 4ab	88
4.3	Etude de la virulence	89
4.3.1	Etude de ActA de <i>L. monocytogenes</i> et Biofilms	89
4.3.2	Etude de souches hypovirulentes et avirulentes.....	89
4.4	Taxonomie.....	90
4.4.1	Nouvelles espèces	90
4.5	Développement de nouveaux outils de typage moléculaire et étude de la diversité des <i>Listeria</i>	90
4.5.1	La diversité environnementale des <i>Listeria</i> : Projet Transversal de Recherche CNRL/LNR	90
4.6	Etude de la résistance aux antibiotiques	92
4.7	Projets collaboratifs	92
4.8	Conclusions	93
5	LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS	94
5.1	Publications nationales.....	94
5.2	Publications internationales	94
5.3	Chapitres de livres	95
5.4	Communications nationales	95
5.5	Communications internationales.....	96
5.6	Conférences sur invitations	96
5.7	Présence dans les médias	96
6	CONCLUSIONS	97
	Références citées	99
1	ORGANISATION DU CNR	105
1.1	Personnel permanent.....	105
1.1.1	Organigramme général et organisation	105
1.1.2	Effectif.....	105

1.2	Locaux	108
1.3	Equipement.....	108
1.4	Mise en place de la démarche de management de la Qualité et hygiène/sécurité au sein du CNRL	110
1.5	Plan de continuité d'activité.....	112
2	ACTIVITES D'EXPERTISE DU CNR DES LISTERIA.....	113
2.1	Capacités techniques, rôles et missions du CNR des <i>Listeria</i>	113
2.1.1	Identification et caractérisation des souches de <i>Listeria</i>	113
2.1.1.1	Méthodes et marqueurs épidémiologiques disponibles.....	113
2.1.1.2	Techniques développées en 2012	116
2.1.1.3	Méthodes en développement.....	116
2.1.1.4	Méthodes en cours de validation.....	117
2.1.1.4.1	Evaluation des kits de sérodiagnostic et de PCR	117
2.1.1.4.1.1	Projet MONALISA : Multicentric Observational National Analysis of LIsteriosis and <i>Listeria</i>	117
2.1.1.4.2	Souches nécessaires à la validation des kits de microbiologie	119
2.1.2	Maintien, détention et diffusion de matériel biologique	119
2.1.2.1	Les souches bactériennes.....	119
2.1.2.2	Les serums	122
2.1.2.3	Les bactériophages	122
2.1.2.4	Diffusion et échange de matériel biologique.....	123
2.1.2.5	Conditions de mise à disposition de ces collections	123
2.1.3	Maintien et curation de bases de données	124
2.1.4	Techniques recommandées par le CNRL	125
2.1.4.1	Recommandations générales.....	125
2.1.4.1.1	En microbiologie clinique	125
2.1.4.1.2	En microbiologie vétérinaire	128
2.1.4.1.3	En microbiologie des aliments.....	128
2.1.5	Travaux d'évaluation et d'amélioration des techniques, réactifs et troupes.....	132
2.1.6	Techniques transférées vers d'autres laboratoires	132

2.1.7 Gestion, protection et sauvegarde de la base de données du CNRL.....132

ANNEXE C : COMMUNICATION NATIONALE – RESUME NON PUBLIE.....144

**ANNEXE D : DISTRIBUTION DES DIAMETRES DES ZONES D’INHIBITION POUR DIFFERENTS
ANTIBIOTIQUES.....145**

RESUME DE L'ANNEE 2012

En 2012, le nombre de cas de listériose déclarés en France a été de 343 cas (+18% par rapport à 2011). Cette augmentation reflète principalement l'augmentation significative des formes neuroméningées par rapport aux années 2006-2011 au second semestre de l'année 2012, sans explication à ce jour. Le taux de létalité de la listériose humaine est de 25 à 30% et le taux d'hospitalisation est supérieur à 93% soulignant l'importance de la surveillance de la listériose humaine. En septembre 2012, une épidémie de 11 cas a été détectée sans identification formelle de la source alimentaire. Le nombre total de souches humaines et non humaines réceptionnées au CNR a augmenté de 40% par rapport à l'année précédente. Le CNRL et ses partenaires de la cellule interministérielle *Listeria* ont publié deux synthèses dans le bulletin épidémiologique hebdomadaire concernant ses activités de surveillance humaines et alimentaires. 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'alertes européennes et internationales.

En 2012, le CNRL a participé à la nouvelle surveillance microbiologique moléculaire au niveau européen en tant que participants aux programmes TESSY (The European Surveillance System) et ELITE (European *Listeria* Typing Exercise). Il a également initié, en tant que centre collaborateur de l'OMS, un réseau international WHO des Centres Nationaux de Référence des *Listeria* regroupant à ce jour 41 pays.

Le CNR des *Listeria* participe 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 CNR a finalisé le développement et la validation d'une méthode MLVA (*Multi Loci Variable Number tandem Repeats Analysis*) pour le typage et le criblage rapide des souches.

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 également 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 également finalisé une étude phylogénétique par Multi-virulence-Locus Sequence Typing (MvLST) afin d'étudier l'intérêt de la prise en compte de la séquence de gènes impliqués dans la virulence pour le typage MLST.

Afin de mieux caractériser les formes cliniques de la listériose, de préciser les modalités diagnostiques et thérapeutiques et d'identifier des facteurs de risque et pronostiques, l'étude prospective cas-témoins MONALISA (clinical trials NCT01520597) a été initiée fin 2009 et se poursuit jusqu'en juillet 2013. Financée principalement par le programme hospitalier de recherche clinique national (PHRC), elle va permettre d'avancer dans la compréhension de cette infection sévère. A ce jour, 356 cas de septicémies, 186 cas d'infections du système nerveux central et 91 cas d'infections materno-fœtales ont été inclus. Cette étude cas-témoins permettra également d'évaluer l'intérêt de nouvelles techniques diagnostiques.

En lien avec l'Unité de Biologie des Infections, 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 (caractérisation des 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'aux USA en 2011 et en 2012 (Anonyme 1998a et 1998b, 2011 ; 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 ; GilMour et al., 2011) et en Europe, notamment en France (Anonyme,

1993a et 1993b ; Aureli et coll., 2000 ; Bille, 1991 ; de Valk et coll., 2001 ; Ericsson et coll., 1997 ; Goulet et coll., 1993, 1995b et 2002 ; Jacquet et coll., 1995a ; Lyytikäinen et coll., 2000 ; McLauchlin et coll., 1991 ; Miettinen et coll., 1999 ; Salamina et coll., 1996) et en 2009 en Autriche (Fretz et coll., 2010).

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

La Direction Générale de la Santé (DGS) a mis en place depuis 1982 un tel système de surveillance [En 2007, Swaminathan et Gerner-Smidt du CDC d'Atlanta ont signalé l'efficacité du modèle français de surveillance de la listériose, le comparant à celui des USA (Swaminathan B. and Gerner-Smidt P., 2007)], avec le Centre National de Référence des *Listeria* (CNRL) localisé initialement à la Faculté de Médecine de Nantes auquel a été adjoint en 1990 le CNRL pour la lysotypie et le typage moléculaire situé à l'Institut Pasteur. Depuis la fermeture du CNR de Nantes en juillet 1993, le Centre National de Référence des *Listeria* a été hébergé par le Laboratoire des *Listeria* puis le Groupe Microorganismes et barrières de l'hôte de l'Institut Pasteur. Il assure la surveillance microbiologique de la listériose en France. Son mandat de CNRL a été renouvelé 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, 2012; 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, 2008, 2012). 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 une augmentation de l'incidence à 4,6 cas/million d'habitants a été constatée et s'est prolongée en 2007 pour atteindre 5 cas/million d'habitants. Depuis 2007, cette incidence est stable autour de 5 cas/million d'habitants (Goulet et coll., 2008 et 2012). Après une légère diminution en 2011, l'incidence calculée par rapport aux données de la déclaration obligatoire en 2012 est remontée à 5,3 cas par million d'habitants.

L'Unité de Biologie des Infections héberge le CNRL dont les missions, l'organisation ainsi que ses activités d'expertises sont décrites en annexes A et B de ce présent rapport. L'Unité héberge également le Centre Collaborateur de l'OMS (Mandat renouvelé en Novembre 2011).

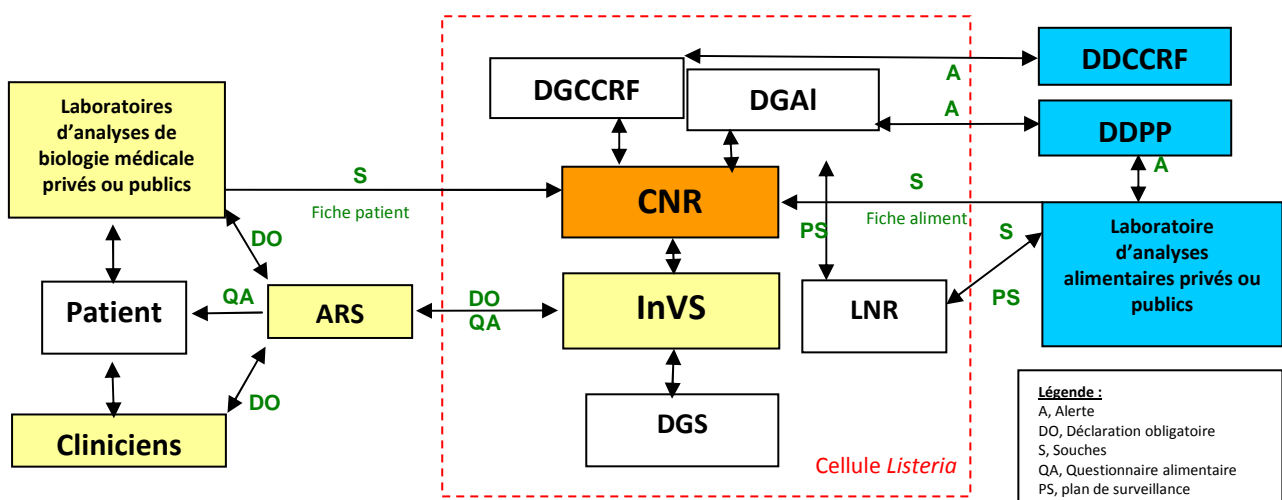
2 ACTIVITES DE SURVEILLANCE

2.1 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 1). 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 LNRI 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 LNRI ont un rôle d'appui scientifique, technique et d'aide à la décision auprès des Directions des 3 ministères concernés.

Figure 1. Schéma de fonctionnement de la cellule *Listeria* conformément aux textes officiels en vigueur.



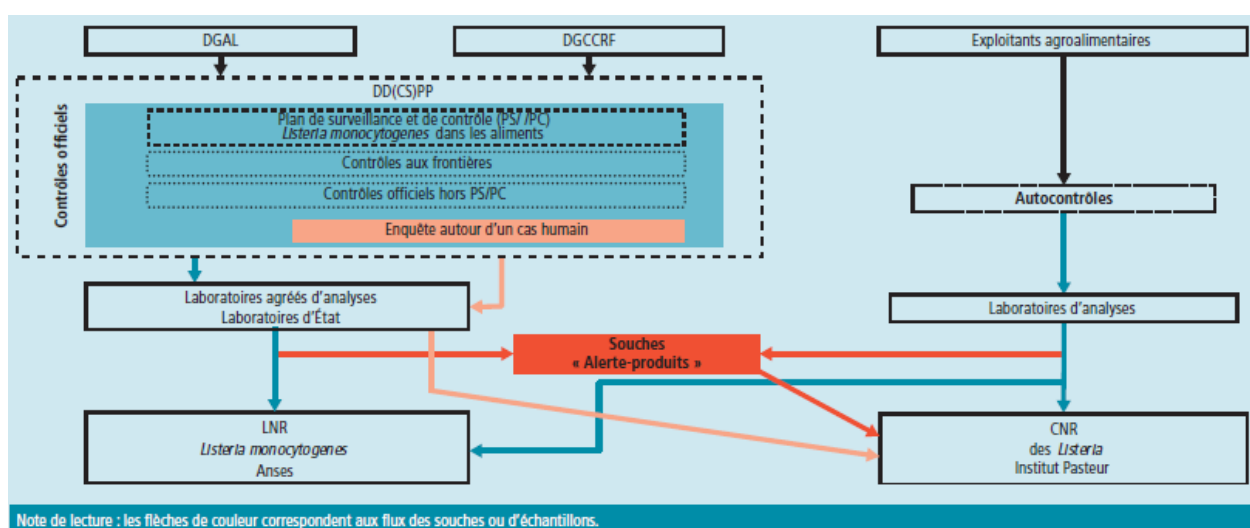
CNR : Centre national de Référence des *Listeria* ; LNR : Laboratoire National de référence ; InVS : Institut de Veille Sanitaire ; DGAI : Direction Générale de l'Alimentation ; DDPP : Directions Départementales de la Protection des Populations ; DDCCRF : Directions Départementales de la Consommation 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.

Ainsi, si on se fonde sur les catégories de l'annexe B 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.

La Figure 2 illustre le circuit des souches sur le schéma de surveillance microbiologique français des *Listeria monocytogenes* dans les aliments.

Figure 2. Circuit des souches sur le schéma de surveillance microbiologique français des *Listeria monocytogenes* (Source : BEH. 2012. Surveillance des *Listeria monocytogenes* dans les aliments. Hors Série : 41-45)



2.1.1 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 avec les enzymes de restriction *Ascl* et *Apal* (et *SmaI* depuis 2007) pour toutes les souches (Graves et coll., 2001 ; Doumith et coll., 2004).

↳ **En 2012, 388 souches d'origine humaine ont été reçues, concernant 338 cas diagnostiqués par des laboratoires de France métropolitaine (plus 2 cas retenus par l'InVS sans souche communiquée par les microbiologistes concernés au CNRL) et 5 cas diagnostiqués par des laboratoires des DROM-TOM.** L'analyse des données de la surveillance figure dans le chapitre 2.4.3. de ce rapport. Cette analyse a été effectuée en tenant compte des seuls cas diagnostiqués en 2012 et inclut des souches reçues au CNRL jusqu'en février 2013 en raison des délais d'isolement et d'envoi des souches (les dernières souches d'une année sont généralement reçues jusqu'au mois d'Avril de l'année suivante).

2.1.2 SURVEILLANCE ET DEPASSEMENT DE SEUIL (SIGNALEMENT)

La surveillance régulière du nombre et des caractéristiques microbiologiques (séovar, groupe PCR et profils de macrorestriction d'ADN) des souches isolées de cas humains a pour but de détecter rapidement une augmentation du nombre de cas provoqués par une souche unique. Lors de la surveillance, le CNRL signale par courrier électronique aux autres membres de la Cellule *Listeria* les cas groupés ou tout autre phénomène considéré comme inhabituel ou anormal. Les critères de signalement, appelé dépassement de seuil en 2012, 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 similaires 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 dépassement de seuil, 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.

→ En 2012, la cellule *Listeria* a fait un bilan des dépassements de seuil de 2006 à 2011. L'analyse des profils de macrorestriction d'ADN impliqués dans ces dépassements de seuil montre que la majorité (42%) sont dus à des *Lm* à pulsotype endémique (M-IVb-210792-210792 ; M-IVb-200792-200792 ; M-IVb-151005-151005), le reste est dû à des pulsotypes fréquents (36%) ou rares (15%). La cellule a acté le déclenchement d'un dépassement de seuil pour les pulsotypes endémiques à 6 cas en 6 semaines, et la réalisation d'un typage moléculaire par l'enzyme *SmaI* à faire de suite. Le CNRL a mis en application cette nouvelle règle début Juillet 2012. La cellule a demandé que le LNRI recherche systématiquement à chaque dépassement de seuil, d'éventuelles souches alimentaires similaires dans sa base de données pour communication au CNRL et actualisation du dépassement de seuil.

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 2012, 13 dépassements de seuils ont été investigués (Cf. chapitre 2.6.5.).

2.1.3 PHASE DE SURVEILLANCE RENFORCEE

Tout dépassement de seuil est suivi d'une phase de surveillance renforcée durant laquelle le CNRL signale toute nouvelle souche d'origine humaine identique à celle du dépassement de seuil 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 dépassement de seuil n'est détecté sur une période de 6 semaines. Le CNRL informe alors la Cellule *Listeria* de la clôture du dépassement de seuil et ne signale plus les cas humains avec une souche identique sauf si la Cellule *Listeria* le demande.

↳ En 2012, 3 dépassements de seuils (L12/01, L12/03, L12/13) ont déclenché une phase de surveillance renforcée (Cf. chapitre 2.6.4. et 2.6.5). En 2012, la cellule *Listeria* a demandé suite aux dépassements de seuil L12/01 et L12/03, un suivi d'un profil atypique sur le territoire français.

2.1.4 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 dépassement de seuil. 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 2012, 3 dépassements de seuils (L12/01, L12/03, L12/13) ont requis la réunion téléphonique de la Cellule *Listeria* mais la phase d'Alerte n'a été déclenchée que pour le dépassement de seuil L12/13 (Cf. chapitre 2.6.5.).

2.1.5 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 dépassement de seuil 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, Morvan et coll. 2010) ;
- 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 2012 sont présentés dans le chapitre 2.4.3.

2.1.6 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)].

Ces infections nosocomiales sont également 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).

Le CNRL a mis en place une macro permettant la détection automatique dans sa base de surveillance des suspicions d'infections nosocomiales (plus de 2 cas en moins de 15 jours

déclarés par un même établissement de santé) et effectue une notification à l'InVS suivi d'une transmission de la comparaison des caractéristiques microbiologiques des souches concernées. En 2012, le CNRL, lors d'une réunion de la cellule *Listeria*, a suggéré de bien différencier les infections nosocomiales ayant pour origine les pratiques de soins ou un défaut d'hygiène d'une origine alimentaire provenant des cuisines de l'établissement médicalisé.

↳ En 2012, ce mode de transmission a été suspecté à 12 reprises (Cf. chapitre 2.6.1.).

2.2 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.

2.2.1 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 et comme appui technique. En collaboration avec l'InVS, il interphase la surveillance microbiologique nationale des *Listeria* avec celle européenne de l'ECDC.

2.2.2 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 LNRI 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 LNRI 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 LNRI, dénommé « *Phylogenetic structure and genomics of major clones of Listeria monocytogenes from clinical and food origins* » a été financé en 2010 et s'est terminé en 2012 (Cf. Chapitre 4.5.1.).

Le CNRL en la personne d'A. Leclercq a participé en 2012 aux groupes d'experts ANSES sur la saisine 2012-SA-0102 de la DGS concernant la réévaluation des produits de la mer à risque pour les femmes enceintes dans le guide PNNS « Le guide nutrition pendant et après la grossesse ».

2.2.3 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 CNRL, 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 ou tout communiqué de presse. 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.

2.2.4 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 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 (Cf. chapitre 4.2.3.) En 2012, le CNRL et le CCOMS ont présenté deux exposés lors de la journée annuelle des LNR et

des LCR (6th Workshop of the NRLs for *Listeria monocytogenes*, Maisons-Alfort, 28-30 Mars 2012) en présence DG SANCO de la Commission Européenne. Les deux exposés furent : « *Listeria monocytogenes* clonal diversity : everything is everywhere, so let's talk the same language » et « MLVA evaluation as a subtyping method for *Listeria monocytogenes* ».

2.2.5 EUROPEAN CENTER FOR DISEASES CONTROL: ECDC

Le CNRL a participé ou contribué activement en 2012:

- aux groupes de travail *Listeria* du réseau européen des maladies d'origine hydrique et alimentaire (FWD) de l'ECDC ;
- au meeting «Multidisciplinary consultation on the ECDC roadmap for integration of molecular typing into European Surveillance and epidemic preparedness », Stockholm, 14 Juin 2012;

↳ Article soumis à *Clinical Microbiology and Infection* sur ce workshop dont A. Leclercq est membre du panel remercié d'experts :

Arnold, C., Myers, R., Green, J., McCarthy, N., Woodford, N., Brown, D., Fisher, I., Parkhill, J., Rizzo, M., Martin, A., Palm, D., and M. Struelens. Systematic review of the public Health effectiveness of molecular typing of bacterial pathogens.

- à l'essai de comparaison interlaboratoire sur les essais PFGE organisé par l'EURL *Listeria monocytogenes* et l'ECDC et obtenu 100% de satisfaction à l'ensemble des paramètres;
- à la notification, en lien avec l'InVS, des 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 épidémiques européens signalés par la plateforme d'échanges ECDC EPIS (Epidemic Intelligence Information System) comme dans le cas de l'épidémie belge (Cf. chapitre 4.1.5.);
- à la compatibilité de sa base de données de typage moléculaire avec celle de l'ECDC TESSY moléculaire en vue de la mise en place en 2013 de la surveillance moléculaire continue européenne (Intervention consultant ECDC Applied Maths, 05 Décembre 2012) et a participé au « Workshop on curation, historical data, selection criteria and cluster detection », Sint Martens, 18-19 Octobre 2012.
- 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 2010-2011 par le paramétrage de l'envoi de souches et le transfert de leurs caractéristiques microbiologiques.
- à la révision des rapports

- « Report on zoonoses and zoonotic agents and foodborne outbreaks 2011 » de l'EFSA pour la section *Listeria*;
- "ECDC Surveillance Report: Surveillance of listeriosis in the EU/EEA, 2006-2009";
- "EFSA-ECDC 2011 European Union: Summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks".
- à la rédaction d'une note d'expertise sur le remplacement du sérotypage classique par le géosérogroupe PCR et la nécessité d'inclure ces données dans la base TESSY.

Le CNRL a discuté avec l'ECDC de l'opportunité de réactiver un programme de surveillance européenne des souches d'origine humaine et d'origine alimentaire de *L. monocytogenes*, Pulsenet Europe. En 2012, l'ECDC a mis en place la base TESSY de surveillance moléculaire européenne (The European Surveillance System) de *Listeria monocytogenes* basée sur le sérotypage, le géosérotypage, et la PFGE *Ascl/Apal*.

2.2.6 CENTER FOR DISEASES CONTROL (CDC, USA)

En 2012, le CNRL/CCOMS a été en lien avec le CDC d'Atlanta, et particulièrement le Dr Peter Gerner-Smidt afin :

- d'optimiser les méthodes PFGE (Nouveau protocole publié fin 2010) et partager des données sur des difficultés techniques comme par exemple la mise en évidence en France de souches avec des profils *Apal* atypiques (une seule bande) ;
- d'investiguer la présence de profils PFGE atypiques en France avec la base Pulsenet USA ;
- de créer un lien entre la nomenclature nationale française de PFGE et la nomenclature du réseau Pulsenet USA.

2.2.7 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'État membre qui détecte le problème et qui a initié les mesures adéquates, telles que le retrait ou le refus de produits alimentaires) à la Commission aux termes du RASFF. La Commission transmet immédiatement ces informations aux membres du réseau. Suite à la

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

En 2012, le CNRL a suivi 3 alertes RASFF dont une alerte médiatisée concernant une fromagerie (Cf. Chapitre 2.6.8.).

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.

2.2.8 CENTRE COLLABORATEUR OMS (CCOMS)

L'Unité de Biologie des Infections héberge également le Centre Collaborateur de l'OMS des *Listeria* (Site web : <http://www.pasteur.fr/ccoms/Listeria>).

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 2012, le CCOMS des *Listeria* a initié un réseau international des Centres et Laboratoires de Référence des *Listeria* (41 pays membres à ce jour).

2.3 CONTRIBUTION OU COLLABORATION A DES PROJETS DE RECHERCHE CLINIQUE OU A DES COHORTES.

Outre le projet PHRC Monalisa déjà décrit, le CNRL participe au projet COMBAT.

2.3.1 COHORTE NATIONALE OBSERVATIONNELLE DES MENINGITES BACTERIENNES COMMUNAUTAIRES DE L'ADULTE (COMBAT)

Le CNRL a été contacté en 2012 par le comité de pilotage de la cohorte nationale observationnelle des méningites bactériennes communautaires de l'adulte. Le CNRL a participé à cette étude en définissant les données microbiologiques à recueillir pour les cas de méningite à *Listeria* qui s'intègrent dans un CRF électronique, et participera de façon prospective à compléter ce CRF pour chaque souche de cas de formes neuroméningées incluses dans cette cohorte.

L'objectif principal de cette étude est d'identifier les déterminants du décès intra-hospitalier des méningites bactériennes de l'adulte. Les objectifs secondaires sont : (i) de décrire les caractéristiques épidémiologiques des méningites bactériennes communautaires de l'adulte, leur évolution et leurs liens avec le statut vaccinal de l'adulte et de son entourage ; (ii) caractériser les échecs cliniques et microbiologiques et leurs déterminants (pharmacologiques, microbiologiques, immunologiques, etc.), et (iii) d'analyser les déterminants des séquelles psycho-sensorielles et de la non reprise de l'activité professionnelle à 1,6 et 12 mois.

2.4 DONNEES DE LA SURVEILLANCE MICROBIOLOGIQUE DE LA LISTERIOSE HUMAINE

2.4.1 CAS DE LISTERIOSE EN FRANCE

2.4.1.1 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 (sérovary 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 se fonde sur l'étude des souches adressées volontairement par les biologistes. Il s'agit donc d'un système dont l'exhaustivité n'est pas nécessairement totale. Ce rapport concerne tous les cas pour lesquels le prélèvement positif à *L. monocytogenes* a été réalisé en 2012 et la souche caractérisée par le CNRL.

En 2012, deux cas ont été retenus par l'InVS alors que le CNRL n'a pas reçu les souches *L. monocytogenes* associées. Ces 2 cas ne seront donc pas retenus dans l'analyse du CNRL qui ne concerne que les souches associées à un cas et réciproquement.

2.4.2 ANALYSE GLOBALE DES CAS DE LISTERIOSE

Nombre total de cas

En 2012, le CNRL a reçu 394 souches humaines (2011 : 315 souches) représentant en fait 349 cas (2011 : 288 cas) de suspicion de listériose. La différence observée s'explique également par l'existence de doublons / triplicats (2012 : 45 souches) de souches par patient, non pris en compte dans l'analyse finale.

Pour 2 cas, l'INVS et le CNRL n'ont pas considéré ces cas comme étant des cas de listériose. Dans un cas, la souche avait été découverte fortuitement sur un prélèvement vaginal d'une patiente asymptomatique qui n'avait pas été traitée. Dans l'autre, la souche provenait d'un échantillon d'oreille d'un nouveau-né qui a été attribué à une probable contamination de laboratoire après investigation par le CNRL, l'ARS, l'INVS et le laboratoire hospitalier correspondant.

Pour 4 cas (1,1 % contre 1,5% en 2011), le CNRL n'a pas confirmé le diagnostic de listériose puisqu'il s'agissait d'une souche de *Listeria innocua* provenant d'une selle suite à une autopsie, et de souches n'appartenant pas au genre *Listeria* mais au genre *Lactobacillus*, *Bacillus* et *Carnobacterium*.

En 2012, les échantillons biologiques négatifs en culture adressés au CNRL dans le cadre de suspicion de listériose pour explorations complémentaires (PCR), dont le diagnostic n'entre pas

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

dans le cahier des charges du CNRL, ont été transférés au service de microbiologie de l'hôpital Necker-Enfants Malades. De plus, 4 selles avec suspicion de présence de *L. monocytogenes* ont été expertisées par le CNRL mais *L. monocytogenes* a été isolée d'une seule selle dont la souche présentait les mêmes caractéristiques microbiologiques que la souche de l'hémoculture de ce patient. En 2012, aucun autre échantillon biologique n'a été expertisé.

Au total, en 2012, le CNRL retient donc 343 cas de listériose (2011 : 283 cas) au jour du traitement statistique de ce rapport (Elimination des souches confirmées « Non *Listeria* » et, dont, d'après les cas recensés par l'InVS de la déclaration obligatoire, 2 cas de différence sans souche associée). Les envois au CNRL ne présentent pas de tubes cassés en 2012. Ces cas étaient répartis en 338 cas en provenance de France métropolitaine et 5 cas en provenance des Départements, Régions et Territoire d'Outre-mer (DROM-TOM) [Réunion (3), Guadeloupe (2)]. Les 5 cas des DROM-TOM sont analysés dans le chapitre 2.4.4.

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, outre les échanges journaliers de données, 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 de la déclaration obligatoire à l'InVS et de l'envoi de la souche correspondante au CNRL a permis en 2012 **un taux d'exhaustivité de 99,4%** (2011 : 100%) 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 2012 dont la dernière a été reçue en Mars 2013. La non-récupération de souches par le CNRL résulte de souches non gardées ou non envoyées par les LABM.

Laboratoires expéditeurs

Parmi les 347 souches qui ont été envoyées pour suspicion de listériose en 2012, 297 (86 % ; 2011 : 247) proviennent de laboratoires hospitaliers, dont deux souches de Monaco, et 50 (14 % ; 2011 : 41) de laboratoires privés. Cette répartition est équivalente à celle de 2011.

- 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 (2010-2011 : 10 jours ; moyenne 2006 à

2010 : 11 jours ; [compris entre 1 et 360 jours]) (Figure 3). La réduction de ce délai est l'un des objectifs majeurs de notre système qualité et du CNRL mais deux souches après relance sont arrivées 9 et 12 mois après la date du prélèvement sur le patient dont elle est issue.

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 jours (2011 : 6,5 jours ; 2010 : 8 jours ; moyenne 2006 à 2010 : 9 jours) ; [compris entre 3 et 42 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 97% des souches en 2012 (2010-2011 : 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 24 fois en 2012 à la demande de l'InVS dont une astreinte de week-end. Les résultats de ces analyses rapides ont été confirmés 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 2012 selon le délai entre le prélèvement et la réception au CNRL (en rouge, la médiane).

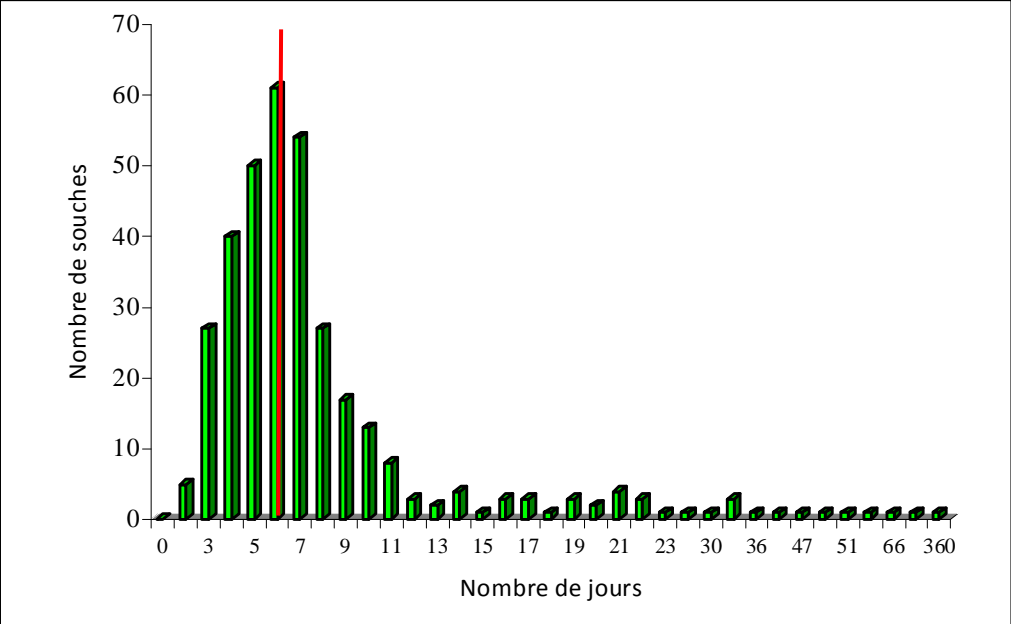
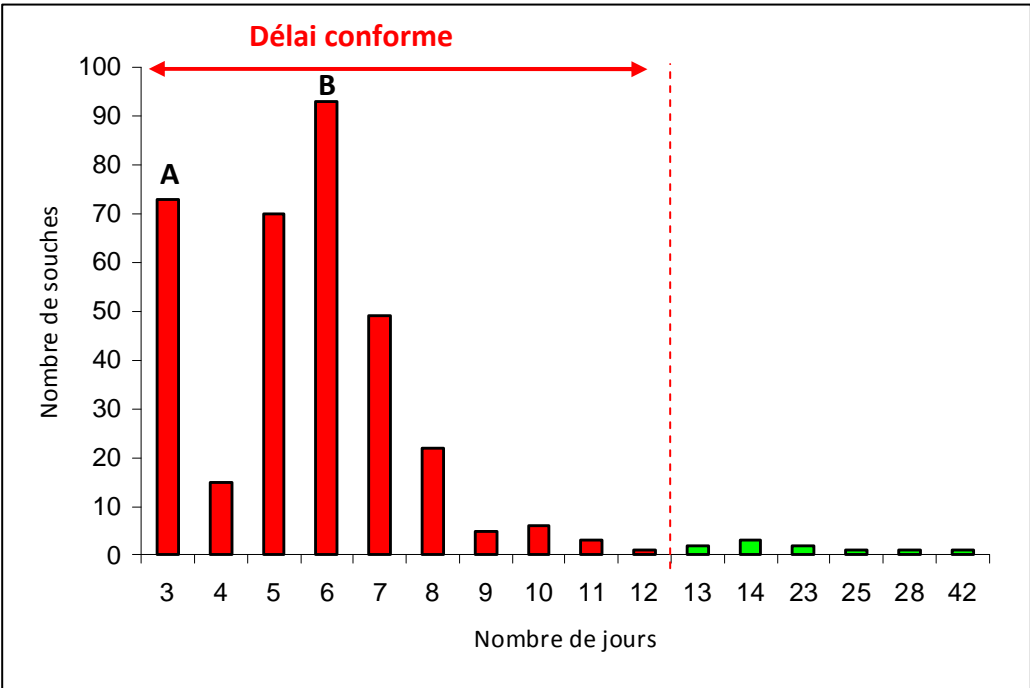


Figure 4. Distribution des souches isolées en 2012 selon le délai entre la réception de la souche au CNRL et l'envoi du rapport d'essai. En rouge, le délai conforme aux procédures du CNRL (A, pic des rapports d'analyses sur l'identification et le sérotype PCR ; B, pic des rapports d'analyses identification, sérotype PCR et PFGE *Ascl/ApaI*).



2.4.3 CAS DE LISTERIOSE EN FRANCE METROPOLITAINE

Le nombre de cas recensés en 2012 par le CNRL provenant de la France métropolitaine est de 338 (2011 : 277 cas). Après une augmentation en 2006, observée également dans de nombreux pays européens, le nombre de cas de listériose diagnostiqués entre 2007 et 2011 semblait stable (Figures 5 et 6) notamment en France. En 2012, une nette augmentation du nombre de cas sans explication à ce jour est à noter, comparable en magnitude à celle de 2006, et avec un nombre total de cas voisin de celui de 1995. Notons qu'une épidémie à 11 cas a été détectée, la précédente épidémie ayant été détectée en 2003. Cette épidémie est constituée de cas groupés liés microbiologiquement et sans doute épidémiologiquement mais dont la source de contamination n'a pas été formellement prouvée (même si une source est hautement suspectée). Ces quelques cas épidémiques seront comptabilisés avec les cas sporadiques dans la suite de ce rapport (Cf. 2.4.1.1) sauf en Figure 6. En 2012, le taux d'incidence moyen des cas de listériose sporadiques était de 5,3 cas par million d'habitants (2006 à 2012 : 4,6 à 5 cas par million d'habitants ; 4,4 en 2011).

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



Le nombre de souches associées à un dépassement de seuil en 2012 est de 94 (27% des souches ; 2011 : 50 (18%)). Le nombre de dépassements de seuil de 13 en 2012 (2011: 09) est plus élevé qu'en 2008 alors qu'il était stable auparavant.

2.4.3.1 DISTRIBUTION TEMPORELLE DES CAS

La distribution mensuelle et trimestrielle des cas sporadiques est représentée pour l'année 2012 dans les Figures 7 et 8.

Le plus grand nombre de cas a été observé au deuxième trimestre 2012, alors que pour les années 2006 à 2011, le trimestre rassemblant le plus grand nombre de cas était le troisième. En 2012, les mois, où l'incidence fut la plus forte, sont Juin puis Mai puis Janvier, Aout et Septembre. Par rapport à 2011, le pic observé en juillet semble s'être décalé sur Juin. Ainsi, la distribution temporelle des cas, et notamment des cas groupés, est variable d'une année à l'autre. Il n'existe pas de véritable variation saisonnière comme pour d'autres microorganismes entéropathogènes.

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

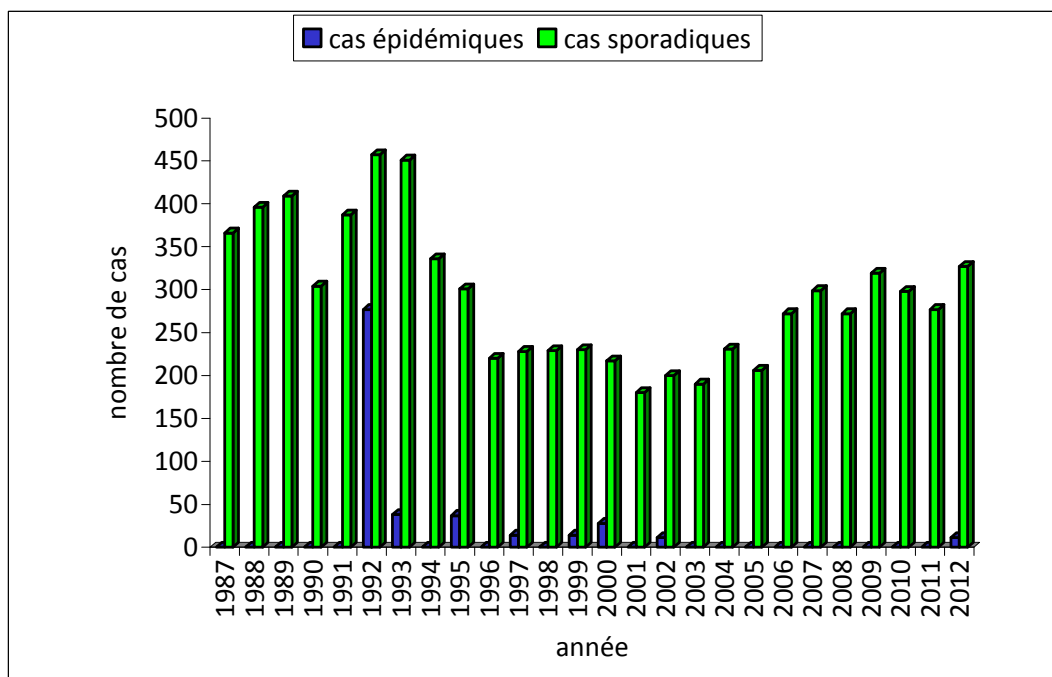


Figure 7 : Distribution mensuelle des cas sporadiques de listériose en France métropolitaine en 2012 (en rouge, les mois avec les plus grands nombres de cas).

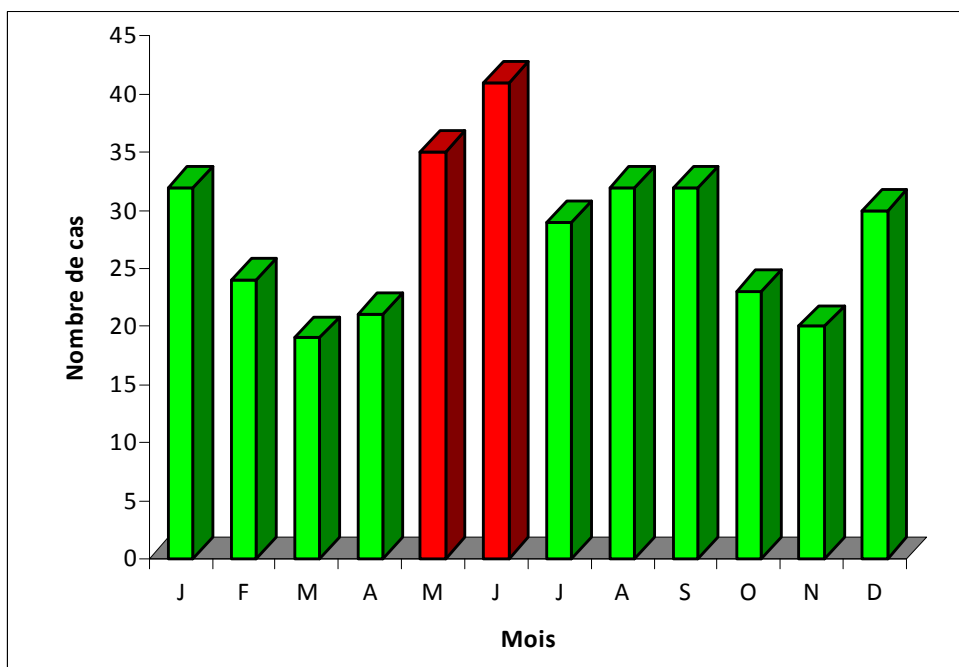


Figure 8 : Distribution trimestrielle des cas sporadiques de listériose en France métropolitaine en 2012 (en rouge, le trimestre majoritaire).

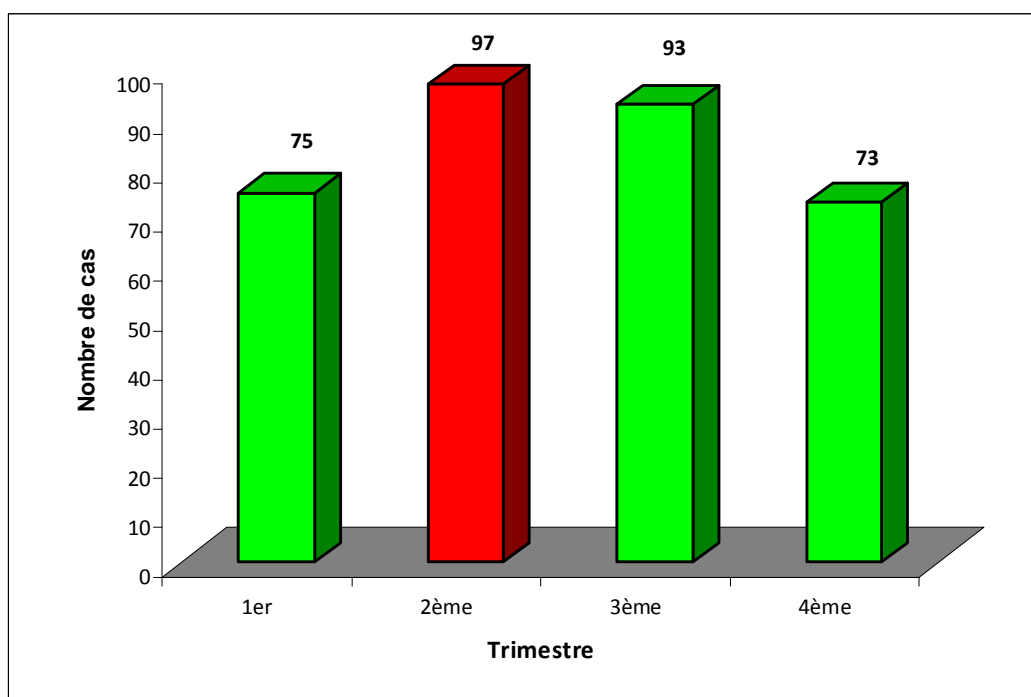
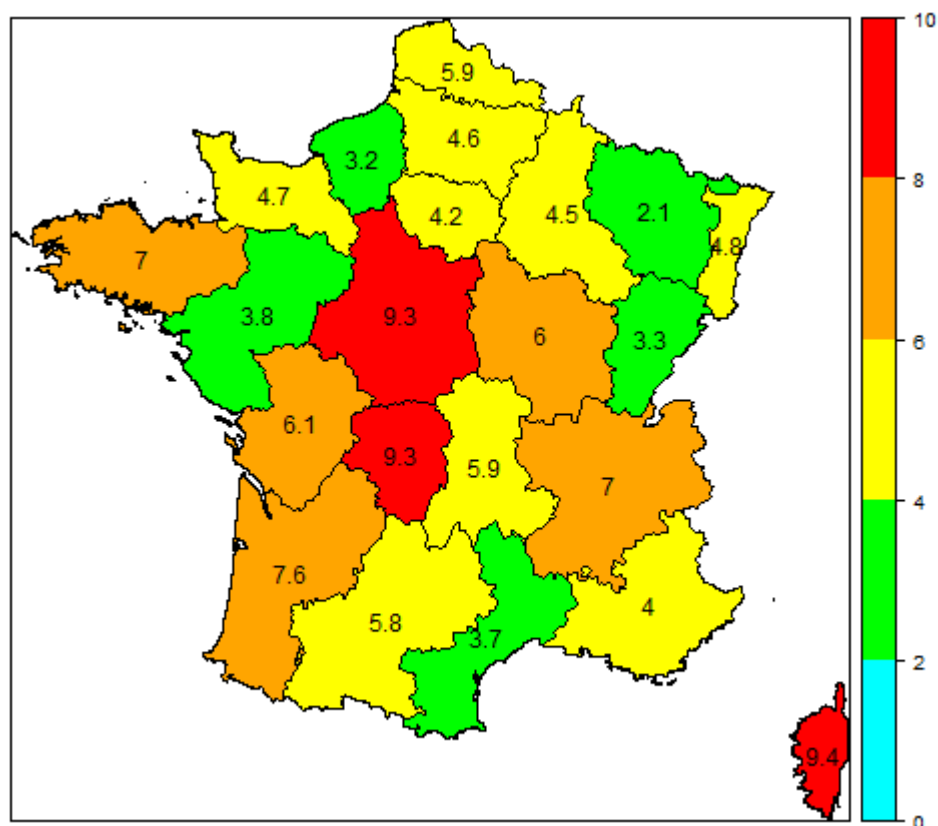


Figure 9 : Incidences régionales globales des cas sporadiques de listériose de 2012 (Echelle en cas par 1.000.000 habitants).



Distribution géographique des cas

La distribution géographique du nombre de cas et des incidences est représentée dans la Figure 9 et le Tableau 1. Les chiffres d'incidence sont exprimés en cas par 1.000.000 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 Corse ($9/10^6$), le Centre ($9/10^6$), et le Limousin ($9/10^6$). L'Aquitaine ($8/10^6$) reste en incidence élevée depuis 2009.
- La région caractérisée par l'incidence la plus basse est la Lorraine ($2/10^6$) et la Haute-Normandie ($3/10^6$). Bien qu'aucune région ne soit caractérisée par une incidence très basse d'une année à l'autre depuis 2006, la Haute Normandie depuis 2011 semble rester avec la plus basse incidence en France.

- Les régions caractérisées par le plus grand nombre de cas, en valeur absolue, sont Ile-de-France (51) et Rhône-Alpes (45), depuis 2007. Les régions caractérisées par les plus faibles nombres de cas, en valeur absolue, sont la Corse (3) et la Franche-Comté (4).

Par département

- Les départements caractérisés par les incidences les plus élevées sont la Haute-Corse (17/10⁶) et les Hauts-Pyrénées (17/10⁶) et non plus le Territoire de Belfort comme en 2011.

- Les départements caractérisés par les incidences les plus basses sont la Moselle (0,9/10⁶) et le Var (0,9/10⁶) et 8 départements pour lesquels l'incidence est nulle (01-43-49-55-61-81-82-90).

Les départements caractérisés par les plus grands nombres de cas, en valeur absolue, sont le Rhône (19), Paris (18) et le Nord (18).

↳ 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.

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 1. 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

2.4.3.2 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 2012, 38 formes materno-néonatales (2011 : 31) ont été enregistrées, représentant 11 % du nombre total de cas sporadiques comme en 2011 (Figure 10). Les formes maternonéonatales sont plus fréquemment rencontrées au second semestre comme en 2006-2010 (Figure 11). La distribution par région est indiquée dans le Tableau 4. Les années 2006, 2008, 2011 et 2012 ont été caractérisées par le plus faible nombre de cas de formes materno-néonatales depuis 1987 (Tableau 2). 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 2012, 300 formes non materno-néonatales ont été enregistrées (contre 246 en 2011), soit 88 % du total des cas sporadiques comme en 2012. Le Tableau 2 indique la répartition de ces formes non materno-néonatales.

Tableau 2. Répartition des formes cliniques de 2006 à 2012.

	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	Total
Formes non materno-néonatales								
Septicémies	170 (71%)	180 (69%)	152 (63%)	170 (62%)	156 (61%)	180 (73%)	169 (56%)	1180
Infections du système nerveux central	54 (22%)	69 (26%)	70 (29%)	85 (31%)	73 (29%)	57 (23%)	104 (35%)	509
Autres formes	16 (7%)	12 (5%)	19 (4%)	19 (7%)	26 (10%)	9 (4%)	27 (9%)	128
Total	240	261	241	274	255	246	300	1817
Formes materno-néonatales								
Total	31	42	27	45	43	31	38	257
Total des formes cliniques	271	303	268	319	298	277	338	2074

- **La proportion et le nombre absolu d'infections du système nerveux central sont, après une diminution en 2010-2011, les plus élevés depuis 2006.** Ce nombre de cas était assez stable depuis 2000, entre 40 et 60 cas/an mais en 2012 une différence significative du nombre de cas a été observée par un total de 104 cas (Tableau 2, Figures 12 et 13). **Les infections du système nerveux central (voir plus bas) sont celles dont le nombre a le plus augmenté en 2012.** Depuis 2008, le nombre de cas est voisin de ceux observés avant 1995.

- **La proportion et le nombre absolu de formes septicémiques, ont diminué par rapport à 2011.** Le nombre de cas de ces formes se rapprochent 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 9 % des cas non materno-néonatales (2006- 2011 : 4 à 10%). En 2011, le nombre de cas est plus élevé qu'en 2011. Il est possible que l'activité du PHRC Monalisa ait pu favoriser la notification de cas non rapportés auparavant. Le Tableau 3 décrit la répartition de ces infections ou colonisations de 2006 à 2013. Une souche de *L. monocytogenes* Groupe PCR IVb a été isolée

d'un cas de diarrhée chronique, sans qu'il soit possible de se prononcer sur l'imputabilité de celle-ci dans cette symptomatologie.

Tableau 3. Répartition des autres formes cliniques de 2006 à 2012.

Autres formes	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	Total
Vasculaire	1	4	0	1	0	2	1	9
Adénopathie	1	0	0	0	1	0	1	3
Cardiaque	2	0	0	1	0	0	0	3
Os/articulaire	4	3	8	7	4	2	5	33
Digestif	0	1	0	0	1	1	3	7
Foie	1	0	2	2	1	0	0	6
Oedeme	1	1	2	2	6	0	0	12
Erysipèle	0	0	0	1	0	0	0	1
Infection du liquide d'ascite	5	3	6	3	10	3	12	42
Infection urinaire	0	0	0	1	1	0	2	4
Pneumopathie	0	0	1	1	2	1	3	8
Prostatite	1	0	0	0	0	0	0	1
Total	16	12	19	19	26	9	27	129

↳ Une investigation microbiologique et clinique de ces différentes formes est en cours.

↳ Pour les infections urinaires, un patient avec une symptomatologie d'infection urinaire basse s'est vu prescrire à deux reprises un ECBU en ville qui se sont avérés positifs à *L. monocytogenes* IIa sans apparemment que le patient ait d'autres signes cliniques au moment des prélèvements comme de la fièvre. Après un épisode de fièvre, il a consulté à l'hôpital où une hémoculture a poussé à *L. monocytogenes* Groupe PCR IIa, ce qui a conduit à le traiter. Cet épisode est en cours d'investigation avec le laboratoire correspondant.

↳ Un patient a présenté une infection sur sa prothèse aortique avec une souche ayant des caractéristiques microbiologiques similaires à celle isolée de son sang 4 mois auparavant lors d'un épisode de bactériémie.

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

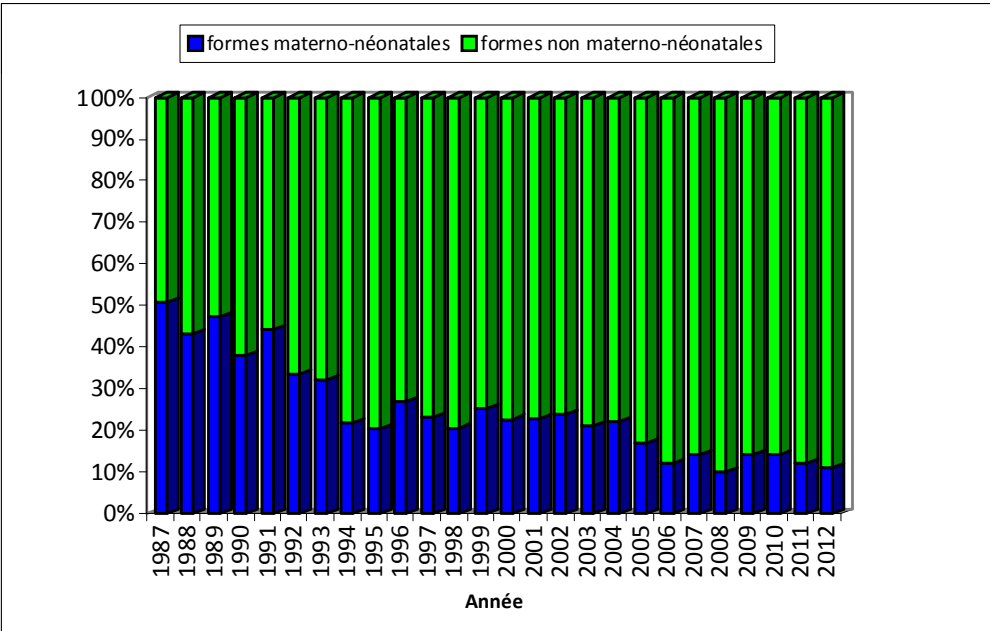


Figure 11. Distribution mensuelle des cas sporadiques de listériose en France métropolitaine en 2012 selon la forme clinique.

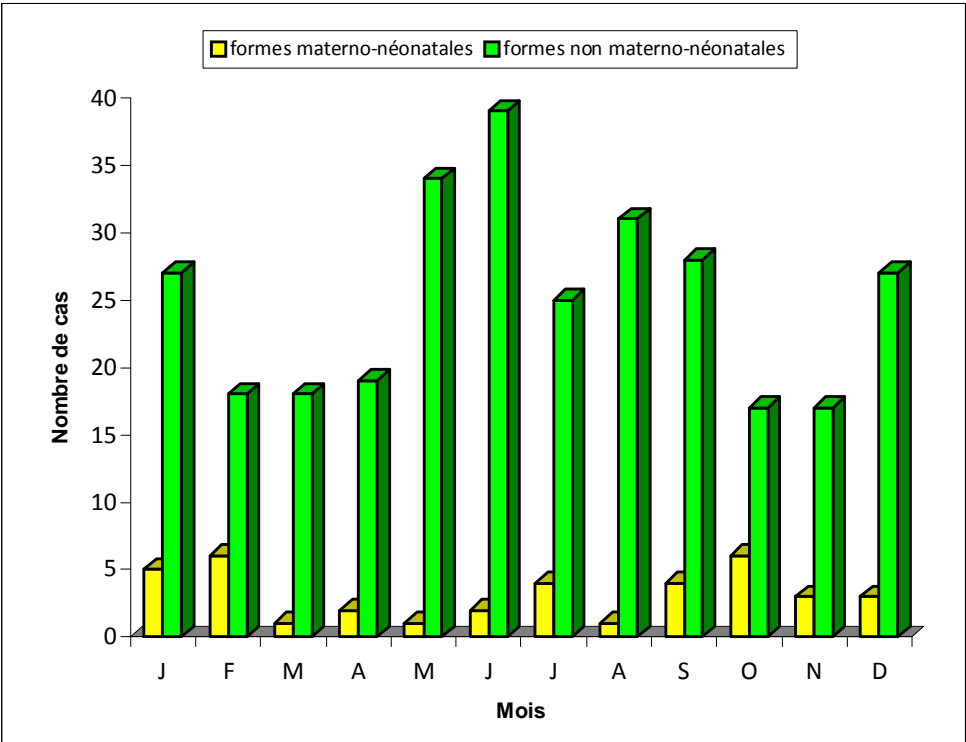


Figure 12. Distribution des infections du système nerveux central et des septicémies pour les cas sporadiques de listériose en France métropolitaine depuis 1987.

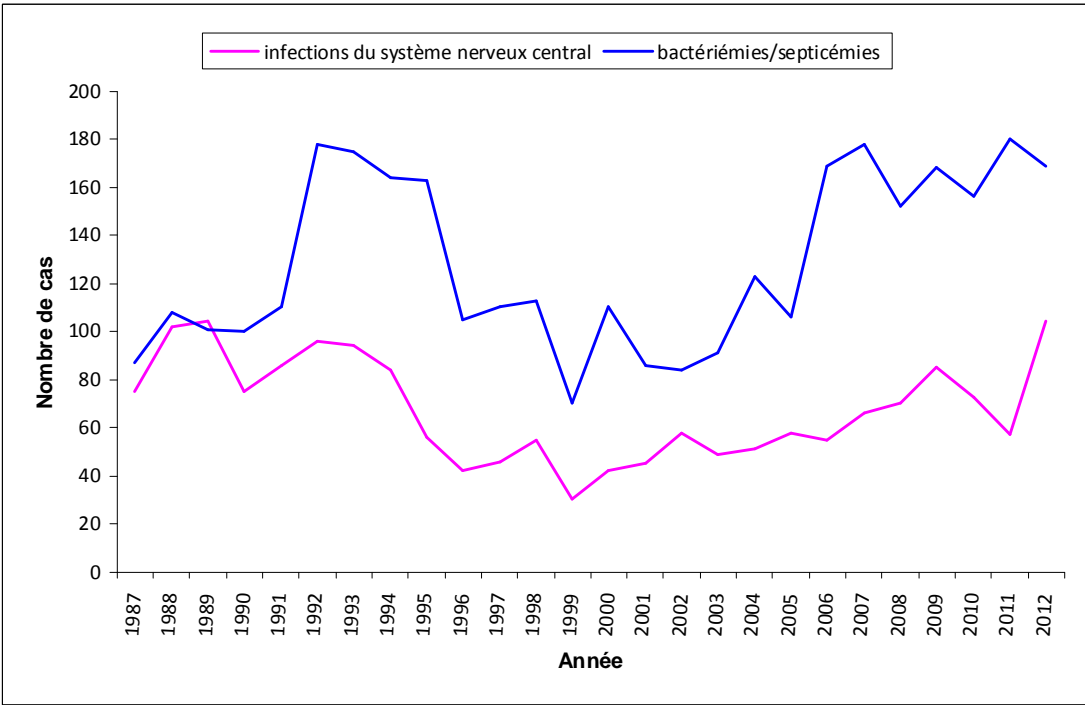
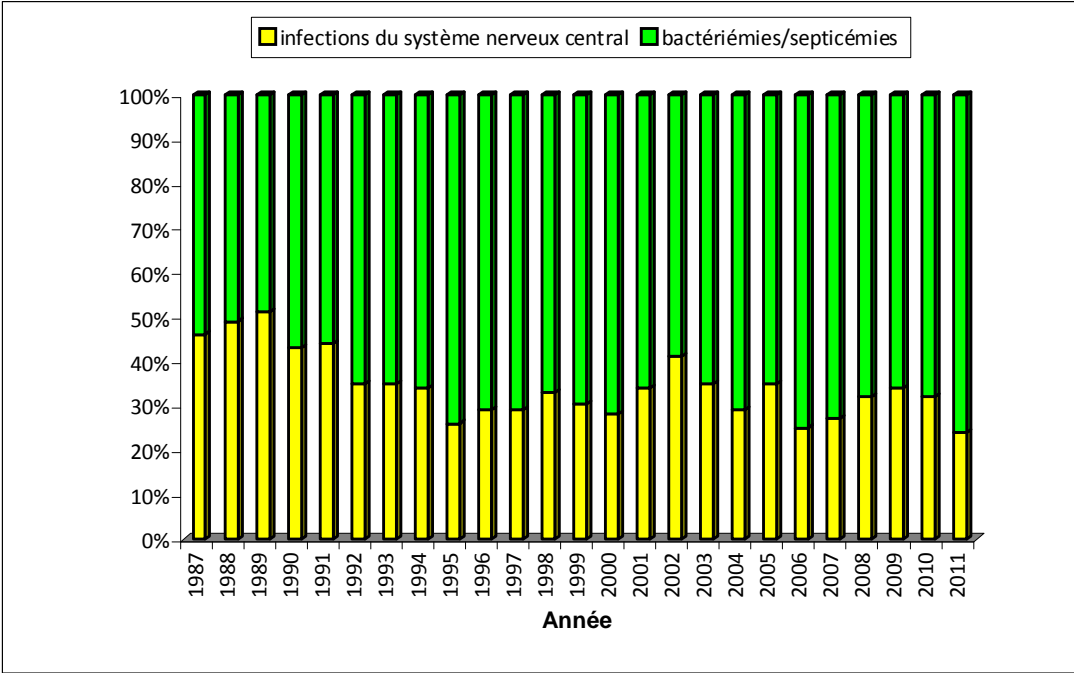


Figure 13. Proportion des infections du système nerveux central et des septicémies pour les cas sporadiques de listériose en France métropolitaine depuis 1987.



Distribution régionale et temporelle

Les distributions régionales et temporelles des formes cliniques sont présentées dans les Tableaux 4 et 5 et les Figures 11 et 14.

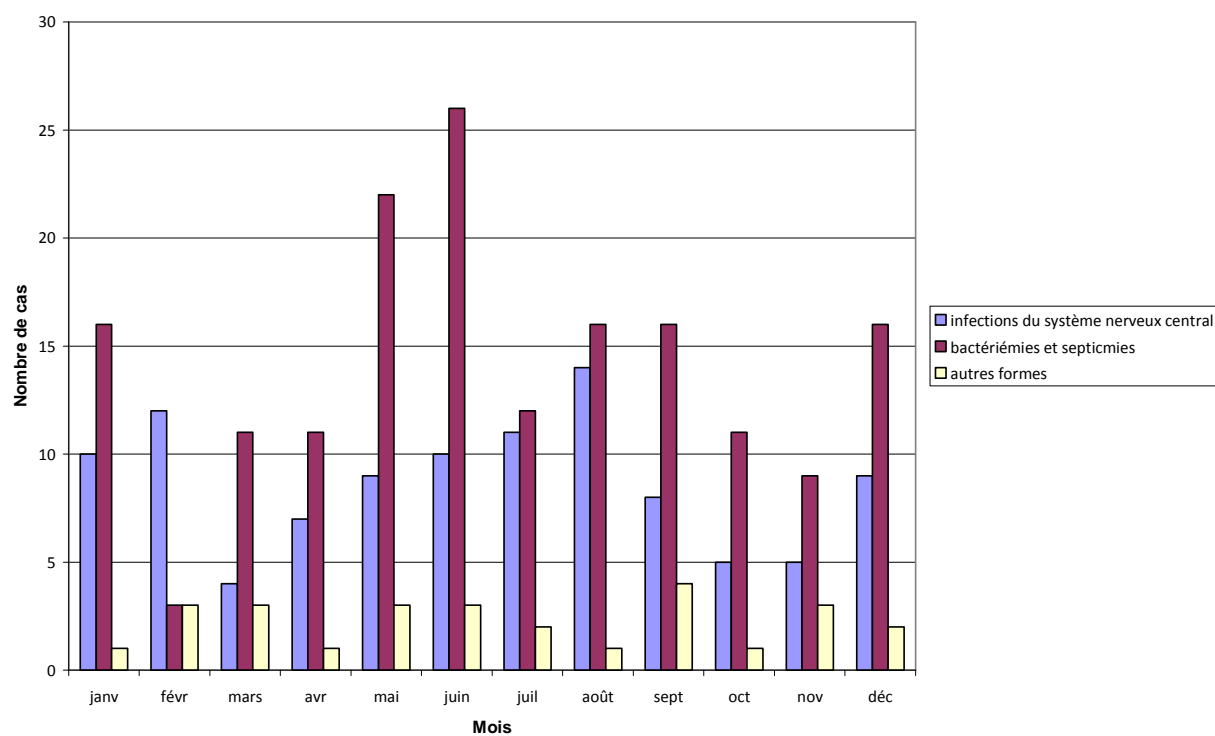
Tableau 4. Distribution régionale des cas sporadiques de listériose en France Métropolitaine en 2012 selon la forme clinique.

Région	Total	Formes materno-néonatales	Formes non materno-néonatales
Alsace	9	2	7
Aquitaine	25	2	23
Auvergne	8	1	7
Basse-Normandie	7	0	7
Bourgogne	10	0	10
Bretagne	23	0	23
Centre	24	3	21
Champagne-Ardenne	6	2	4
Corse	3	0	3
Franche-Comté	4	0	4
Haute-Normandie	6	0	6
Ile-de-France	51	12	39
Languedoc-Roussillon	10	1	9
Limousin	7	1	6
Lorraine	5	0	5
Midi-Pyrénées	17	0	17
Nord-Pas-de-Calais	24	2	22
Pays de la Loire	14	3	11
Picardie	9	2	7
Poitou-Charentes	11	1	10
Provence-Alpes-Côte-D'azur	20	1	19
Rhône-Alpes	45	5	40
Total	338	38	300

Tableau 5. Distribution mensuelle des formes sporadiques de listériose non materno-néonatale en France métropolitaine en 2012.

Mois	Infections du système nerveux central	Septicémies	Autres formes	Total
J	10	16	1	27
F	12	3	3	18
M	4	11	3	18
A	7	11	1	19
M	9	22	3	34
J	10	26	3	39
J	11	12	2	25
A	14	16	1	31
S	8	16	4	28
O	5	11	1	17
N	5	9	3	17
D	9	16	2	27
Total	104	169	27	300

Figure 14. Distribution mensuelle des formes sporadiques de listériose non materno-néonatale en France métropolitaine en 2012.



Terrain

L'existence ou non d'une affection sous-jacente ou concomitante était renseignée dans 300 cas soit 89%, proportion habituellement constatée depuis 2006 (2011 : 89 %). Pour 181 patients (60% des cas renseignés, contre 50% en 2011 et 62% en 2010), une ou plusieurs affections sous-jacentes, décrites pour favoriser la listériose, étaient rapportées : cancer, cirrhose, éthyisme, diabète, dialyse, infection par le VIH, transplantation d'organe et traitement immunosuppresseur. Les 119 patients restants (40 %) 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. L'étude MONALISA permettra de compléter ces informations.

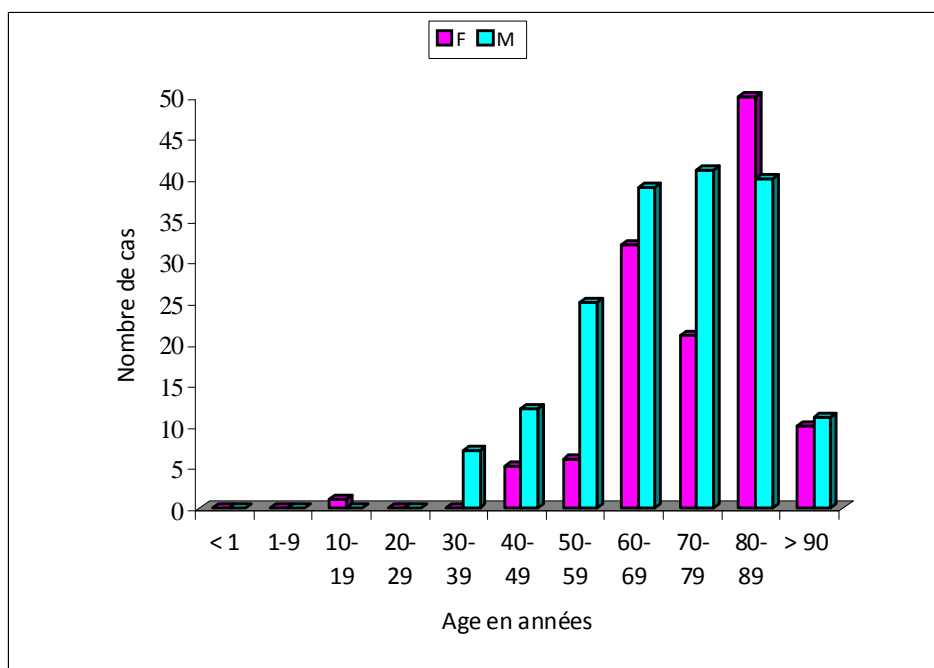
Age et sexe des patients avec listériose non materno-néonatale sporadique

Comme en 2011, l'âge moyen était de 72 ans en 2012 [12 à 98 ans] ce qui est comparable aux valeurs annuelles depuis 2007 (69 ans). Dans 244 cas (81 %), l'infection est survenue après 60 ans, dans 55 cas (18 %) entre 21 et 60 ans et dans 1 cas (0.3 %) avant 21 ans, tous sexes et formes cliniques confondus (Figure 15). Ces chiffres sont comparables à ceux obtenus entre 2006 et 2011. La population à risque pour les formes non materno-néonatales reste donc constituée par les personnes de plus de 60 ans, et notamment de plus de 70 ans. Le sexe ratio M/F était de 1,4 en 2012 comme environ entre 2006 à 2011. Cette relative prédominance de la listériose chez l'homme s'observe quelle que soit la forme clinique et est inexplicée (Tableau 6 et Figure 16). 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 équivalence de cas masculins et de cas féminins (10 cas contre 11), attribuable à l'espérance de vie accrue des femmes.

Tableau 6. Distribution par classe d'âge, par sexe et par forme clinique des formes non materno-néonatales sporadiques en France métropolitaine en 2012.

Sexe	Classe d'âge	Total	Infections du système nerveux central		
			Septicémies	Autres formes	
F	> 28 jours-20 ans	1	1	0	0
	21-60 ans	11	3	7	1
	> 60 ans	113	40	61	12
M	> 28 jours-20 ans	0	0	0	0
	21-60 ans	46	24	17	5
	> 60 ans	131	38	84	9
Total	> 28 jours-20 ans	1	1	0	0
	21-60 ans	57	27	24	6
	> 60 ans	244	78	145	21

Figure 15. Distribution par classe d'âge et par sexe des formes sporadiques de listériose non materno-néonatale en France métropolitaine en 2012.



2.4.3.3 DISTRIBUTION DES SOUCHES SELON LE GROUPE PCR

Analyse générale

Les résultats obtenus pour les 338 (2011: 277) souches d'origine humaine de France métropolitaine sont présentés dans le Tableau 7.

Tableau 7. Répartition des groupes PCR par année depuis 2006.

Groupe PCR	Souches du sérovar	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
IIa	1/2a ou 3a	79(29%)	90(30%)	89(33%)	88(28 %)	100(34%)	85(31%)	98 (29%)
IIb	1/2b, 3b ou 7	47(17%)	45(15%)	27(10%)	47(14 %)	40(13%)	40(14%)	43 (13%)
IIc	1/2c ou 3c	11(4%)	14(5%)	11(4%)	24(8 %)	5(2%)	6(2%)	12 (3%)
IVb + IVb-v1*	4b, 4d ou 4e	133+1(50%)	151+2(50%)	141(53%)	159(50%)	153(51%)	146(53%)	185 (55%)
L	4ab ou 4c ou 4a	0 (0%)	1 (<1%)	0 (0%)	1 (<1 %)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Total		271	303	268	319	298	277	338

* 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. En 2012, comme depuis 2006, le groupe PCR majoritaire est le IVb représentant 55% des souches suivi du IIA puis IIb puis IIc. Depuis 2006, il y a presque 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 IIa sont majoritaires (Figure 21). Cependant, comme le montre la Figure 16, le groupe PCR IVb semble globalement en augmentation progressive depuis 1992. 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 2012, 11 dépassements de seuil ont été associés à des souches du groupe PCR IVb, 2 dépassements de seuil au groupe PCR IIa et 1 au groupe PCR IIb, ce qui est comparable à 2010 où le groupe IVb était majoritaire (Cf. chapitre 2.6.5.). 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). On peut noter que le groupe PCR IVb est prédominant en été.

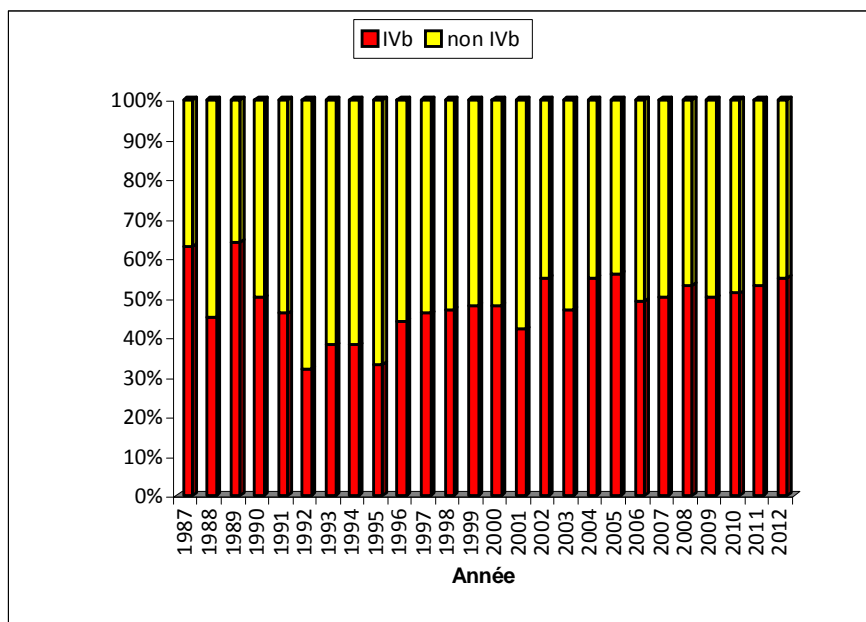
Distribution régionale des groupes PCR

La distribution régionale des souches par groupe PCR (Tableau 8) ne permet pas de mettre en évidence de distribution particulière pour chacun de ces groupes PCR.

Tableau 8 : Distribution régionale des cas sporadiques de listériose en France métropolitaine en 2012 selon les groupes PCR.

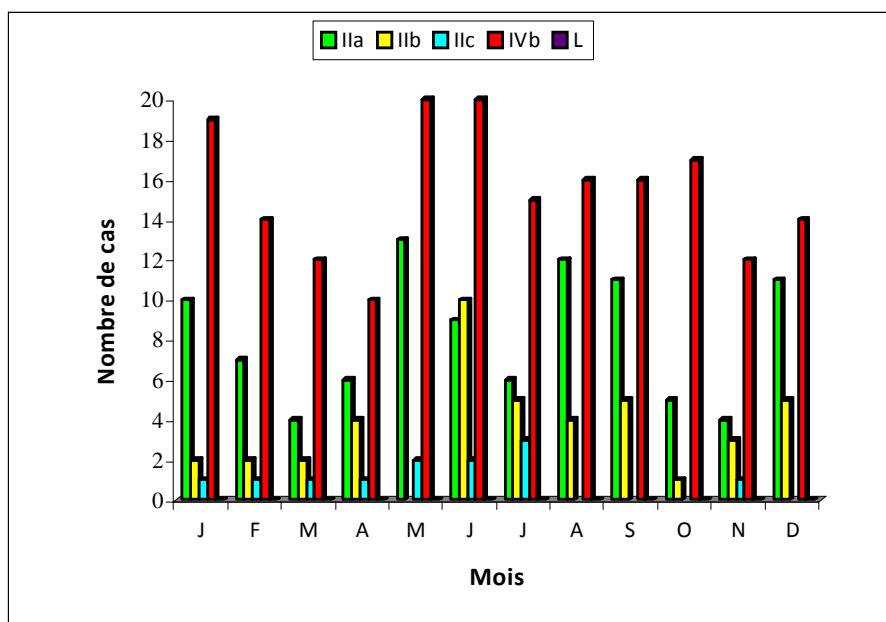
Région	Total	IIa	IIb	IIc	IVb
Alsace	9	2	2	1	4
Aquitaine	25	5	1	2	17
Auvergne	8	3	1	0	4
Basse-Normandie	7	5	1	0	1
Bourgogne	10	3	0	0	7
Bretagne	23	8	5	0	10
Centre	24	5	1	0	18
Champagne-Ardenne	6	2	3	0	1
Corse	3	1	0	0	2
Franche-Comté	4	1	1	0	2
Haute-Normandie	6	2	2	1	1
Ile-de-France	51	13	8	0	30
Languedoc-Roussillon	10	3	1	2	4
Limousin	7	4	1	0	2
Lorraine	5	2	0	0	3
Midi-Pyrénées	17	3	2	2	10
Nord-Pas-de-Calais	24	10	3	1	10
Pays de la Loire	14	2	1	1	10
Picardie	9	0	2	0	7
Poitou-Charentes	11	4	2	0	5
Provence-Alpes-Côte-D'azur	20	7	3	0	10
Rhône-Alpes	45	13	3	2	27
Total	338	98	43	12	185

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 2012.



Distribution des groupes PCR selon la forme clinique

Comme de 2006 à 2011, les souches du groupe PCR IVb (souches de sérovar 4b, 4d ou 4e) sont majoritaires, quelle que soit la forme clinique (Tableaux 9 à 12). 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 Ib et le IIa dans des proportions proches. Le groupe PCR IIc, plus rare, a été principalement associé à des septicémies.

Formes materno-néonatales

Tableau 9. Répartition des groupes PCR des souches de formes materno-néonatales de 2006 à 2012.

	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
IIa (souches de sérovar 1/2a ou 3a)	3	7	3	5	9	5	3
IIb (souches de sérovar 1/2b, 3b ou 7)	5	6	0	7	9	6	5
IIc (souches de sérovar 1/2c ou 3c)	0	1	0	2	0	0	0
IVb + IVb-v1* (souches de sérovar 4b, 4d ou 4e)	23	27+1	24	31	25	20	30
L (souches de sérovar 4a, 4c, 4ab)	0	0	0	0	0	0	0
Total	31	42	27	45	43	31	38

* variant du PCR Group IVb

Formes non materno-néonatales

Tableau 10. Répartition des groupes PCR des souches des septicémies de 2006 à 2012.

	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
IIa (souches de sérovar 1/2a ou 3a)	53	62	61	56	59	70	57
IIb (souches de sérovar 1/2b, 3b ou 7)	31	32	19	28	19	26	20
IIc (souches de sérovar 1/2c ou 3c)	9	12	9	15	3	6	9
IVb + IVb-v1* (souches de sérovar 4b, 4d ou 4e)	77	72+1	63	71	75	78	83
L (souches de sérovar 4a, 4c, 4ab)	0	1	0	0	0	0	0
Total	170	180	152	170	156	180	169

* variant du PCR Group IVb

Tableau 11. Répartition des groupes PCR des souches des infections du système nerveux central de 2006 à 2012.

	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
IIa (souches de sérovar 1/2a ou 3a)	14	18	18	21	22	9	29
IIb (souches de sérovar 1/2b, 3b ou 7)	8	7	6	10	6	5	14
IIc (souches de sérovar 1/2c ou 3c)	2	0	1	7	1	0	2
IVb + IVb-v1* (souches de sérovar 4b, 4d ou 4e)	29+1	44	45	46	44	43	59
L (souches de sérovar 4a, 4c, 4ab)	0	0	0	1	0	0	0
Total	54	69	70	85	73	57	101

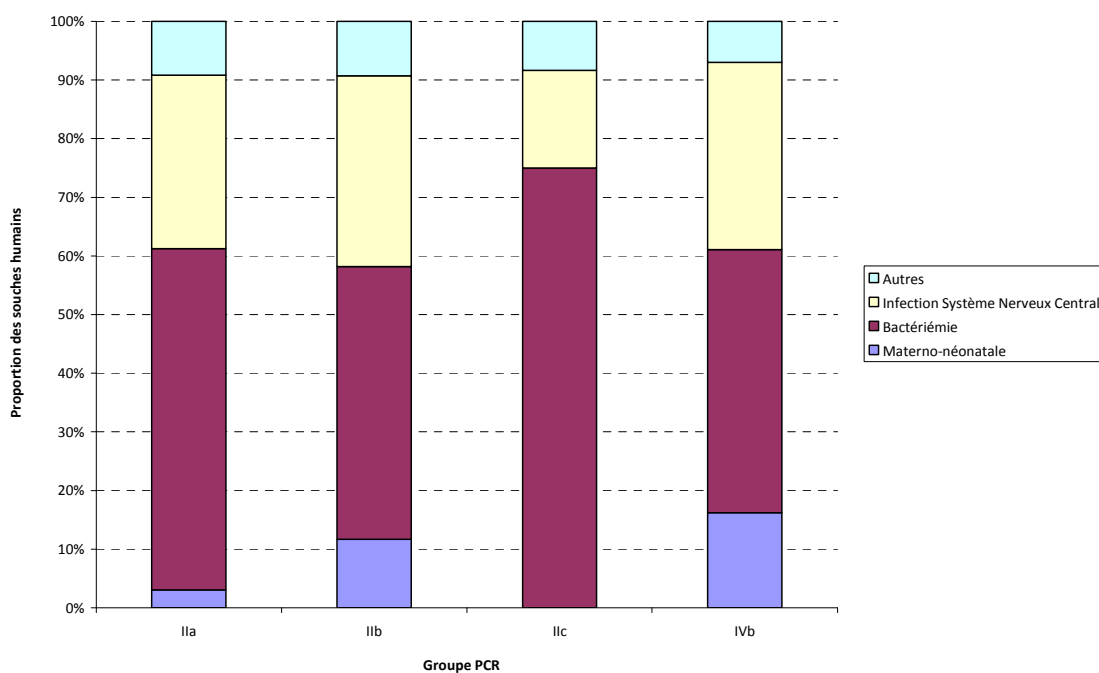
* variant du PCR Group IVb

Tableau 12. Répartition des groupes PCR des souches des autres formes de 2006 à 2012.

	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
IIa (souches de sérovar 1/2a ou 3a)	9	3	7	6	10	1	9
IIb (souches de sérovar 1/2b, 3b ou 7)	3	0	2	2	6	3	4
IIc (souches de sérovar 1/2c ou 3c)	0	1	1	0	1	0	1
IVb + IVb-v1* (souches de sérovar 4b, 4d ou 4e)	4	8	9	11	9	5	13
L (souches de sérovar 4a, 4c, 4ab)	0	0	0	0	0	0	0
Total	16	12	19	19	26	9	27

* 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 2012.



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 13). 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 13. 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 2012.

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	11	3	1	2	5	0	0
	> 60 ans	113	37	16	2	58	0	0
M	> 28 jours-20 ans	0	0	0	0	0	0	0
	21-60 ans	44	16	5	2	21	0	0
	> 60 ans	131	38	16	6	71	0	0
Total	> 28 jours-20 ans	1	1	0	0	0	0	0
	21-60 ans	55	19	6	4	26	0	0
	> 60 ans	244	75	32	8	129	0	0

2.4.4 CAS DE LISTERIOSE DANS LES DROM-TOM

En 2012, 5 cas sporadiques de listériose (contre 6 en 2011) ont été notifiés pour des patients résidant dans les DROM-TOM et sont décrits dans le Tableau 14.

En 2012, la CIRE Guadeloupe a demandé une comparaison des souches humaines suite à l'apparition de 3 cas en 6 mois mais ces souches présentaient des caractéristiques microbiologiques différentes.

Tableau 14. Distribution par forme clinique et groupe PCR des souches de *L. monocytogenes* isolées des cas provenant des DROM-TOM en 2012.

DROM/TOM Formes cliniques	Nombre	Groupe PCR			
		IIa	IIb	IIc	IVb
Réunion					
Bactériémie	2	1	0	0	1
Materno-néonatales	1	1	0	0	0
Guadeloupe					
Bactériémie	1	1	0	0	0
Infection Système Nerveux Central	1	1	0	0	0
TOTAL	5	4	0	0	1

2.4.5 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 dépassement de seuil 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 2012 sensibles à la pénicilline, à l'ampicilline, à l'amoxicilline, à l'imipénème, au triméthoprim, à la gentamicine, à la kanamycine et à la streptomycine (Annexe D). Certains CNR européens déclarent constater des souches de sensibilité diminuée à la gentamicine. Le CNR sera vigilant sur ce sujet et effectuera des E-tests sur les souches borderlines.

Toutes les souches étaient sensibles à l'érythromycine, au linézolid, à l'acide fucidique, la vancomycine, et le chloramphénicol. Treize souches présentaient une résistance à la ciprofloxacine. Deux souches présentaient une résistance à la tétracycline. Ces résistances avaient été également observées en 2011 et ces 2 antibiotiques ne sont pas considérés comme des antibiotiques adaptés au traitement de la listériose.

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.

→ *L. monocytogenes* est une bactérie pour laquelle il est certes décrit des résistances acquises à certains antibiotiques d'intérêt clinique, mais ceci reste extrêmement rare. *L. monocytogenes* est constamment sensible à l'amoxicilline et à la gentamicine, qui constituent actuellement le traitement de référence de la listériose quelle que soit sa forme. L'identification en 2007 d'une souche résistante au triméthoprimé 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.

→ Le mécanisme de résistance à la rifampicine d'une souche humaine isolée en 2009 provenant d'un cas d'infection sur prothèse de hanche a été étudié et est en cours de publication.

2.4.6 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 Pulsenet 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 dépassements de seuil, ce qui représente un surcoût substantiel.

Le système d'électrophorèse en champ pulsé utilisé depuis août 1999 est le système CHEF et il s'agit de la vingtième année d'utilisation de la PFGE pour le typage des *L. monocytogenes* depuis la publication originelle. Les dépassements de seuil 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*, We = *weihenstephanensis*, Fl = *fleischmannii*), 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.

→ En 2012, à la demande de cette cellule *Listeria*, le CNR a modifié cette nomenclature pour lui ajouter une lettre qui correspond au sous-type Smal quand il a été déterminé (par exemple M-Ilc-301006/301006/B).

En 2012, une indication sur la rareté ou non du profil et sa nouveauté a été incorporée aux rapports et tableaux de la surveillance microbiologique.

Analyse des profils de macrorestriction d'ADN présents dans les dépassements de seuil

Si l'on examine les profils des souches ayant occasionné des dépassements de seuil depuis 2006 (année de changement de la définition du dépassement de seuil), on s'aperçoit que certains profils sont majoritairement rencontrés en France (Tableau 15) et, aux vues des données du CCOMS, également hors de France. Ces profils sont au nombre de 20 ce qui ne constitue pas particulièrement une grande diversité mais démontre la présence de clones majeurs réapparaissant au cours des années. En 2012, seul un nouveau profil sur les 13 dépassements de seuil est apparu. Le profil 310801/310801 avait été signalé dans le rapport d'activité du CNRL 2010 comme très fréquent et sans dépassement de seuil associé. Par contre, depuis 2011, un dépassement de seuil par an avec ce profil est constaté.

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 dépassements de seuil. Un dépassement de seuil avec un profil rare permet de suspecter une souche d'une denrée importée et peut permettre une investigation épidémiologique plus « facile » qu'un profil circulant largement en France. En outre, l'information de rareté ou d'absence sur le territoire français peut conduire à requérir l'aide des autres pays européens par le biais de la plateforme EPIS de l'ECDC.

Tableau 15 : Distribution par profils Ascl et Apal et groupe PCR des dépassements de seuil de 2006 à 2012.

Profils Ascl/Apal	Groupe PCR	Nombre de dépassements de seuil par année							Nombre total de dépassements de seuil
		2006**	2007	2008	2009	2010	2011	2012	
050207/050207	IIa	0	0	0	0	0	0	1	1
271106/271106	IIa	1	0	0	0	0	0	0	1
020511/020511	IVb	0	0	0	0	0	1	0	1
230908/180110bis	IIa	0	0	0	0	1	0	0	1
090507/180407	IIb	0	1	0	0	0	0	0	1
210792/201104	IVb	1	0	0	0	0	0	0	1
160907/160907	IVb	1	0	0	0	0	0	0	1
200792/170407	IVb	0	1	0	0	0	0	0	1
241006/241006	IIa	0	0	0	1	0	0	1	2
310801/310801	IIb	0	0	0	0	0	1	1	2
301006/301006	IIc	0	0	0	1	1	0	0	2
220803/200792	IVb	0	1	1	0	0	0	0	2
180110/190110	IVb	0	0	0	0	1	0	2	3
151005/111206	IVb	0	0	1	1	2	0	1	5
010901/020701	IIa	2	2	0	1	0	0	0	5
011001/160602	IVb	1	1	1	3	0	1	1	8
270801/050506	IVb	2	3	0	0	1	1	2	9
151005/151005	IVb	1	1	1	2	2	2	1	10
210792/210792	IVb	1	2	2	1	3	2	2	13
200792/200792*	IVb	1	4	3	1	2	1	1	13
Total		11	16	9	11	13	9	13	82

* 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 dépassement de seuil

Analyse des profils de macrorestriction d'ADN des souches humaines

Le Tableau 16 présente les fréquences majeures des profils de macrorestriction d'ADN des souches humaines en 2012.

Lorsque l'on analyse les profils de macrorestriction d'ADN des formes cliniques, il apparaît que quelque soit la forme, le profil M-IVb-210792-210792 du groupe IVb est majoritaire. 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 IIa, IIb, IIc qui ne sont pas moins fréquemment responsables des autres formes, ce qui témoigne de la possibilité d'un effet barrière moins fort au niveau intestinale que placentaire et hémato-encéphalique. En 2012, le profil M-IVb-180110-190110 a occasionné quelques cas en Février-Mars, principalement d'infections materno-néonatales, et a été responsable de 2 dépassements de seuil en 2012.

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 17). Les profils majoritaires en fréquence sont ceux des dépassements de seuil en général. Les nouveaux profils pour les souches humaines semblent être stables à 25 profils par an.

Tableau 16. Hiérarchisation des profils de macrorestriction d'ADN des souches humaines de 2012 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 dépassement de seuil
		SEP	ISNC	AUT	MN	
M-IIb-090507-180407	2	0	0	1	0	
M-IVb-270801-200312	3	2	0	0	1	
M-IIa-130607-150408	3	2	1	0	0	
M-IVb-170809-180809bis	3	1	1	0	1	
M-IIa-200212-131107	3	2	1	0	0	
M-IIa-271106-271106	4	2	2	0	0	
M-IVb-140907-070907	4	4	0	0	0	
M-IIb-310801-310801	4	1	2	1	0	L11/01, L12/09
M-IVb-141107-200792	5	1	4	0	0	
M-IIa-080507-020507	5	4	0	1	0	
M-IIa-050207-050207	6	5	1	0	0	L12/11
M-IIa-260606-260606	6	6	0	0	0	
M-IIb-010107-010107	6	4	1	1	0	
M-IIa-241006-241006	7	5	2	0	0	L09/03, L12/12
M-IIc-301006-301006	7	5	1	1	0	L09/08, L10/02,
M-IVb-180110-190110	8	2	1	0	5	L12/01, L12/03
M-IVb-151005-220607bis	8	6	1	0	1	
M-IIa-010901-020701	8	5	1	0	1	L06/03, L06/10, L07/08, L07/12, L09/11
M-IVb-011001-160602	9	6	3	0	0	L06/11, L07/13, L08/02, L09/02, L09/05, L09/10, L11/06, L12/08
M-IVb-151005-111206	12	5	3	2	2	L08/08, L09/04, L09/07, L10/01, L10/10, L12/06
M-IVb-270801-050506	17	8	6	2	1	L06/05, L06/09, L07/02, L07/11, L07/16, L10/06, L11/04, L12/04, L12/10
M-IVb-200792-200792	20	9	8	2	1	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, L12/05
M-IVb-151005-151005	21	8	8	2	3	L06/04, L07/04, L08/06, L09/09, L10/05, L10/12, L11/07, L11/09, L12/07
M-IVb-210792-210792	39	11	13	3	12	L06/02, L07/07, L08/03, L08/07, L09/06, L10/04, L10/09, L10/11, L11/05, L11/08, L12/02, L12/13

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

Tableau 17. Fréquence et Nombre de pulsotypes *Ascl/Apal* de 2008 à 2012 en France métropolitaine

	2008	2009	2010	2011	2012
Pulsotype déjà connu identifié une fois	96	96	84	94	65
Pulsotype identifié 2 -5 fois	26	24	33	31	22
Pulsotype identifié 6-12 fois	7	5	3	4	13
Pulsotype identifié >12 fois	2	6	5	4	5
Nouveaux pulsotypes identifiés*	57	44	28	25	25
Total des pulsotypes <i>Ascl/Apal</i>	268	319	298	277	338

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

2.5 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) ainsi que de la direction générale des douanes et droits indirects (DGDDI), 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.

En 2011, la surveillance microbiologique au niveau des souches des aliments et de l'environnement réceptionnées au CNRL dans le cadre d'une alerte produit ou d'une enquête autour de cas humains a été allégée. Un tableau synthétique regroupe les données sur les souches, les caractéristiques microbiologiques et la présence ou non de cas humains avec la même caractéristique microbiologique ainsi que leur nombre et si ceux sont des formes neuroméningées. En 2012, une indication sur la prévalence du profil (nouveau, peu fréquent/rare (<6 cas/an), fréquent (6-12 cas/an) et endémique (>12 cas/an)) a été incorporée à ce tableau de la surveillance microbiologique. Ce tableau permet de tendre vers l'exhaustivité

des souches d'alertes produits par l'échange constant d'informations CNRL-DGAI et d'effectuer des relances, comme c'est le cas avec les souches humaines.

2.5.1 ANALYSE GENERALE

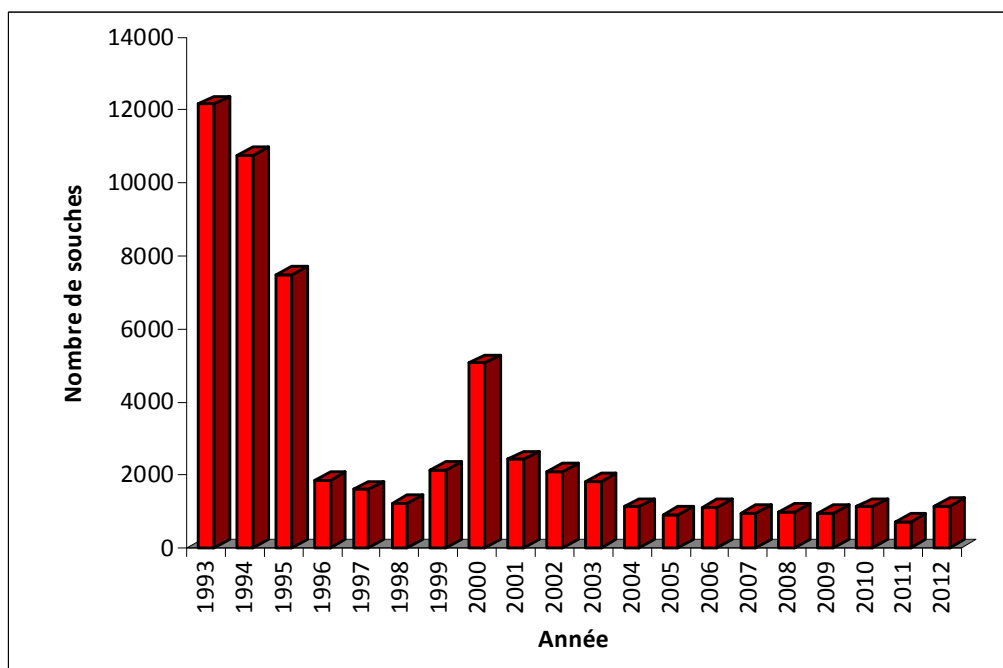
Cette activité consiste principalement à caractériser les souches isolées d'aliments ou de leur environnement, en particulier les souches de *L. monocytogenes* pour :

- participer à l'identification du véhicule alimentaire en cas de dépassement de seuil 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 dépassement de seuil voire en début d'épidémie.

En 2012, 1143 souches d'origine non humaine ont été adressées au CNRL par des laboratoires français (2011 : 707 souches), soit une augmentation de +38% par rapport à 2011 (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 depuis 2011.

La plupart de ces laboratoires utilisent des méthodes normalisées et internationalement reconnues ou des méthodes alternatives validées pour la détection, l'énumération et l'identification des espèces de *Listeria*. Ainsi, comme depuis 2007, 96% 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 et ce qui n'est pas conforme à ses critères d'acceptation des souches. L'étape de purification imposée pour la microbiologie alimentaire dans les normes ISO 11290 et ses méthodes alternatives ne semble pas être effectuée systématiquement. Cette purification en cas d'urgence ou en cas d'alertes produits peut allonger le résultat de typage moléculaire des souches et entraîner un possible retard dans l'identification de l'origine alimentaire de cas humains.

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



La répartition des souches de 2012 suivant la catégorie de laboratoires était la suivante :

- Laboratoires Vétérinaires Départementaux (LVD) : 387 souches (34 %) [2011 : 214],
- Laboratoires privés d'hygiène alimentaire : 689 souches (60 %) [2011 : 436],
- Laboratoires Interrégionaux de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes : 17 souches (2 %) [2011 : 44],
- Laboratoires ANSES – LNRI : 45 souches (4%) [2011 : 0],
- Laboratoire d'Hygiène de Centres Hospitaliers : 5 souches (<1%) [2011 : 0].
- Laboratoire de recherche : 0 souches (0%) [2011 : 10].

La proportion de souches envoyées par les laboratoires vétérinaires départementaux (34% en 2012 contre 30% en 2011) par rapport aux souches envoyées par les laboratoires privés d'hygiène alimentaire n'a pas baissé contrairement aux années précédentes. Le document de la DGAI ci-après décrit les règles sur la gestion des alertes produits et d'envoi des souches au CNRL (http://agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/_Guide_Gestion_Alerte_Revision_2_ilt_2009_COMPLETEE_VDef_cle09fc34.pdf).

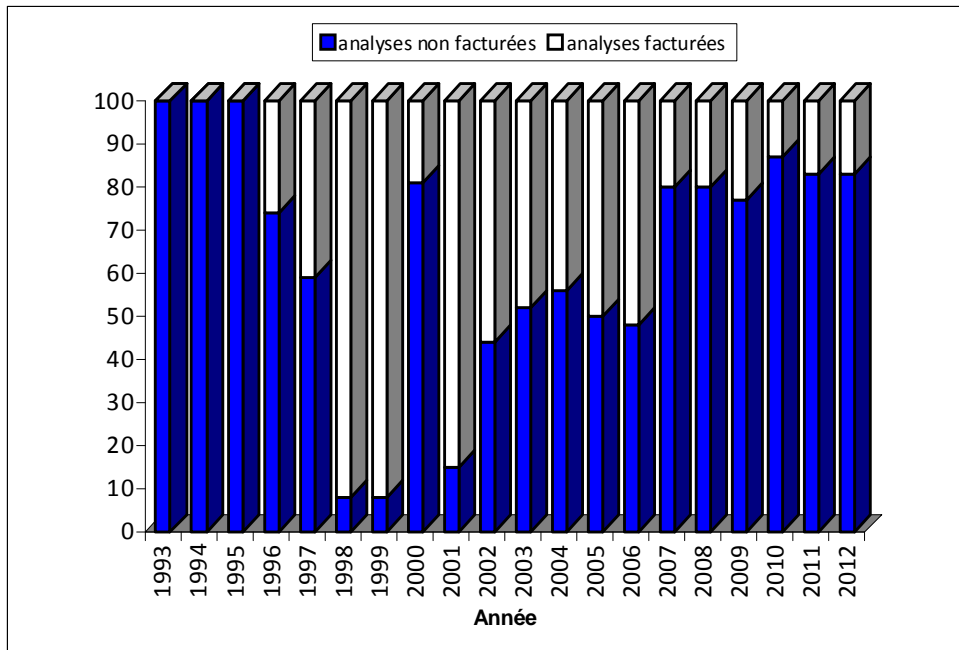
L'origine des souches était la suivante :

- souches isolées d'aliments : 941 souches (82 %) [2011 : 594],
- souches isolées de l'environnement : 182 souches (16 %) [2011 : 101],
- souches de recherche/sans information: 18 souches (2 %) [2011 : 11],
- souches isolées chez l'animal : 1 souches (<1 %) [2011 : 1].

Les proportions respectives des origines des souches sont globalement stables depuis 2006. Les souches de recherche/sans information ont été des souches dans le cadre d'une enquête sur une contamination intralaboratoire d'échantillons dans un Centre hospitalier, des souches d'essais interlaboratoires et des souches de clients privés. Une partie des souches alimentaires et de l'environnement sont des souches réceptionnées de laboratoires d'analyses privés pour caractérisation et sont isolées dans le cadre d'autocontrôles en majorité. 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 (dépassements de seuil, 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 2012, comme en 2011, 17 % des essais ont fait l'objet d'une facturation (Figure 20). Cette proportion est donc stable. 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 rentreraient directement dans le système de surveillance français de la listériose. Ces souches sont traitées de façon confidentielle à la demande du client.

Figure 20. Pourcentage d'essais facturés depuis 1993.



2.5.2 SOUCHES ISOLEES D'ALIMENTS

2.5.2.1 CATEGORIES DE LABORATOIRES AYANT ADRESSE LES SOUCHES

La provenance des 941 souches isolées d'aliments en 2012 (2011 : 594 souches), selon la catégorie de laboratoires, était la suivante :

- Laboratoires Vétérinaires Départementaux (LVD): 281 souches (30%) [2011 : 175],
- Laboratoires privés d'hygiène alimentaire : 608 souches (65%) [2011 : 372],
- Laboratoires Interrégionaux de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes: 17 souches (2%) [2011 : 44],
- Laboratoire ANSES-LNRI : 33 souches (3 %) [2011 : 3],
- Laboratoires d'hygiène de Centres Hospitaliers : 2 souches (<1 %) [2011 : 0].

↪ **En 2012, le nombre de souches a augmenté de +37% par rapport au nombre de 2011 mais les proportions par rapport aux catégories de laboratoires correspondants du CNRL sont équivalents sauf pour les laboratoires interrégionaux DGCCRF dont les envois sont en baisse.**

2.5.2.2 NOMBRE DE SOUCHES ET DISTRIBUTION PAR ESPECE

933 (99%) des 941 souches (2011 : 587 sur 594) ont été identifiées. Les analyses sur 8 souches (2011 : 7) n'ont pas été effectuées car il ne s'agissait pas de souches de *Listeria* ou la souche était non viable.

La répartition par espèce des 933 souches de *Listeria* était la suivante :

- *L. monocytogenes* : 908 souches (97 %) [2011 : 576],
- *L. ivanovii* subsp. *ivanovii* : 11 souches (1 %) [2011 : 1],
- *L. ivanovii* subsp. *londoniensis* : 1 souche (<1 %) [2011 : 1],
- *L. innocua* : 7 souches (1 %) [2011 : 6],
- *L. welshimeri* : 5 souches (<1 %) [2011 : 3],
- *L. grayi* : 1 souches (<1 %) [2011 : 0],

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 <3 %).

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 *Listeria monocytogenes*.

↳ En 2012, 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, principalement de l'industrie laitière et de la viande.

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

L'origine des 908 souches (2011 : 576) de *L. monocytogenes* selon la catégorie d'aliment, était la suivante :

- viande et produits carnés : 438 souches (48%) [2011 : 218],
- lait et produits laitiers : 269 souches (30%) [2011 : 182],
- produits de la pêche : 52 souches (6 %) [2011 : 93],
- végétaux : 7 souches (<1%) [2011 : 9],
- autres aliments : 141 souches (16%) [2011 : 68],
- Sans information : 1 souches (<1%) [2011 : 6].

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.

En 2012, on peut constater que les souches d'origine viande et produits carnés ont augmenté de 10% alors que celles des produits de la pêche ont diminuées de 10%.

2.5.2.4 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 18. Le groupe majoritaire est le groupe PCR IIa (sérovars 1/2a, 3a) représentant 57% des souches en 2012 comme depuis 2006 (autour de 60%) suivi du groupe PCR IVb (sérovars 4b, 4d et 4e) représentant 17% des souches puis 13% le groupe PCR IIb (sérovars 1/2b, 3b, et 7) et 13% le groupe PCR IIc (sérovars 1/2c, 3c). L'ensemble des groupes PCR II représentent 83 % (proportion stable) 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 17 % des souches isolées des aliments (Figure 21). Le nombre de souches du groupe PCR IVb pour ces trois dernières années est stable sauf en 2010. La même stabilité est observée pour le groupe PCR II (IIa, IIb, IIc). En revanche, le groupe PCR IIc augmentait depuis 2008 et semble se stabiliser depuis 2011. Il est à noter que les proportions des souches humaines et alimentaires pour le groupe PCR IIb sont proches.

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.

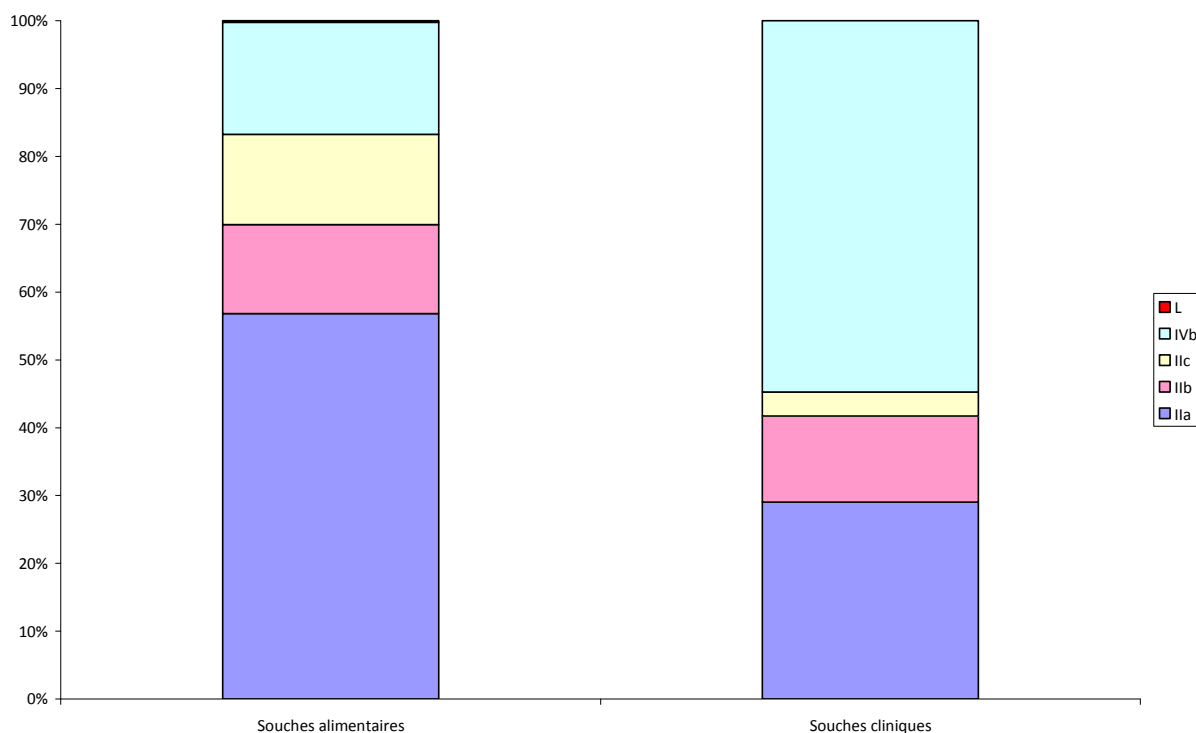
InIA est une protéine permettant l'internalisation de *Listeria* dans les cellules et la traversée des barrières intestinale et placentaire si elle est exprimée en surface de la bactérie, comme c'est le cas chez les souches de sérovars 4b et 1/2b, alors que ce n'est que très rarement le cas pour les 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 18. Distribution par groupe PCR et par catégorie d'aliments des 908 souches de *L. monocytogenes* reçues en 2012 de laboratoires français.

Groupe PCR	viande et produits carnés	lait et produits laitiers	produits de la pêche	végétaux	autres aliments	origine non précisée	Total
IIa	235	158	44	4	74	1	516 (57%)
IIb	67	33	2	0	17	0	119 (13%)
IIc	91	4	1	0	25	0	121 (13%)
IVb	43	74	5	3	25	0	150 (17%)
L	2	0	0	0	0	0	2 (<1%)
Total	438 (48%)	269 (30%)	52 (6%)	7 (<1%)	141 (16%)	1 (<1%)	908

Depuis 2009, le groupe PCR IIb pour les autres aliments (plats cuisinés) dépassait la proportion du groupe PCR IVb ce qui n'est plus le cas en 2012.

Figure 21. Distribution des groupes PCR des souches de *L. monocytogenes* cliniques et alimentaires en 2012.



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

Dans le chapitre 2.4.6. 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 Ia 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 19, on peut observer que :

- Des profils majoritaires dans les souches alimentaires sont retrouvés dans ceux des souches cliniques et des dépassements de seuil.
- 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 dépassements de seuil futurs à surveiller.

En 2012, 10% des souches typées présente un profil unique (contre 9% entre 2006-2010 et 15% en 2011).

Tableau 19. Profils de macrorestriction majoritaires (>5) en 2012 pour les souches alimentaires

Profils de macrorestriction (Espèce-Groupe PCR-Pulsovar Ascl- Apal)	Nombre de souches alimentaires	Présence dans les profils des souches cliniques majoritaires (>3)	Nombre de dépassements de seuil 2012 avec ce profil
M-IIa-010607bis-010607	6		0
M-IIa-160907bis-160812	6		0
M-IIa-241006-230905bis	6		0
M-IIb-090507-180407	6	X	0
M-IVb-011001-160602bis	6	X	0
M-IIb-180407-180407	7		0
M-IIb-180906-180906	7		0
M-IVb-151005-111206	7	X	1
M-IIa-050207-021212	8		0
M-IIb-240707-310801bis	9		0
M-IIa-050207-270807	10		0
M-IIa-150708-160907bis	10		0
M-IVb-270801-050506	10	X	2
M-IIa-010901-020701	11	X	1
M-IIa-230905-230905bis	11		0
M-IIa-271006-050207	11		0
M-IIa-100308-010607	12		0
M-IIa-111109-270707bis	12		0
M-IIa-271106-271106	13	X	0
M-IVb-151005-151005	13	X	1
M-IIb-231006-310801	14		0
M-IIb-310801-310801	21	X	1
M-IIa-270707-270707	22		0
M-IIa-070408-090408	24		0
M-IVb-210792-210792	24	X	2
M-IIa-020407-020407	31		0
M-IVb-200792-200792	41	X	1
M-IIc-301006-301006	76	X	0
M-IIa-241006-241006	89	X	1

2.5.3 SOUCHES ISOLEES DE L'ENVIRONNEMENT

En 2012, 182 souches (2011 : 101) provenant de l'environnement ont été reçues au CNRL, adressées par les Laboratoires Vétérinaires Départementaux [105 (58 %)] et des laboratoires privés [77 (42%)]. Il s'agit environ du nombre constaté en 2010, malgré une baisse en 2011. Ceci peut provenir d'une meilleure explication 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 et, en 2012, de la parution par l'EURL *Lm* d'un guide complémentaire à la norme EN ISO 18593 sur les prélèvements de surface pour *L. monocytogenes* "Guidelines on sampling the food processing area and equipment for the detection of *L. monocytogenes* " (<http://www.ansespro.fr/eurl-Listeria/Documents/LIS-Cr-201213D1.pdf>).

Il s'agissait dans 176 cas (97 % ; 2011 : 97%) de souches de *L. monocytogenes*, dans 2 cas de souches de *L. innocua*, dans 1 cas d'une souche non *Listeria* et dans 1 cas d'une souche de *L. fleischmannii* qui est une nouvelle espèce de *Listeria* décrite en 2012. Ceci indique bien la nécessité pour le CNRL de suivre attentivement et d'actualiser ses méthodes analytiques pour intégrer dès que possible les nouvelles espèces de *Listeria*.

La répartition par groupe PCR des 176 souches de *L. monocytogenes* est la suivante :

- groupe PCR IIa (sérovars 1/2a et 3a) : 108 souches (61 %) [2011 :36],
- groupe PCR IIb (sérovars 1/2b, 3b et 7) : 24 souches (14 %) [2011 :12],
- groupe PCR IIc (sérovars 1/2c et 3c) : 24 souches (14 %) [2011 :12],
- groupe PCR IVb (sérovars 4b, 4d et 4e) : 20 souches (11 %) [2011 :15].

Comme pour les souches isolées d'aliments, les souches des groupes PCR IIa, IIb et IIc sont majoritaires, soit 89 % des souches de *L. monocytogenes* isolées de l'environnement.

Les profils de macrorestriction d'ADN majeures associées aux souches de l'environnement (fréquence >3) sont par ordre décroissant : M-IIa-241006/241006 comme en 2011; M-IIc-301006-301006 comme en 2011 ; M-IIb-310801bis-310801 et M-IVb-270801-050506bis. On retrouve ceux des souches alimentaires majoritaires. Ces 4 derniers profils font parties de ceux des souches cliniques majoritaires et ont donné lieu à au moins un dépassement de seuil en 2012 sauf le profil M-IIc-301006-301006 qui a donné un dépassement de seuil en 2009-2010 et qui semble s'implanter dans les produits à base de viandes de porcs.

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.

↳ En 2012, une souche de l'environnement a été caractérisée comme la nouvelle espèce décrite de *L. fleischmannii* et provenait d'un ensilage.

2.6 BILAN DES INVESTIGATIONS, DEPASSEMENTS DE SEUIL ET ALERTES

Le détail des dépassements de seuil 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.

2.6.1 SUSPICIONS D'INFECTIONS NOSOCOMIALES

Depuis 2012, le CNRL utilise une alerte informatique pour détecter les suspicions d'infections nosocomiales paramétrée pour signaler toute souche d'un même centre de soins sur une période de moins de 15 jours qui ne sont pas des doublons. Ces suspicions sont alors signalées à l'InVS avant d'envoyer un rapport de comparaison des caractéristiques microbiologiques des souches humaines signalées. Une enquête est alors conduite entre l'InVS (et l'ARS), la DGAI et le CNRL ainsi qu'avec le CLIN et l'hygiéniste pour trouver l'origine de cette infection nosocomiale.

À 21 reprises en 2011 (contre 5 en 2011), le diagnostic de plusieurs cas de listériose groupés temporellement et géographiquement (même hôpital, voire même service) a fait suspecter une source nosocomiale. 3 infections nosocomiales dans des Centres Hospitaliers ont été établies. Comme l'a demandé le CNRL à la cellule *Listeria*, il est important de segmenter les infections nosocomiales issues des pratiques de soins et de l'hygiène hospitalière, de celles liées à l'alimentation et aux cuisines centrales ou non des hôpitaux.

→ En 2012, la cellule *Listeria* a décidé qu'en parallèle de l'investigation des formes neuroméningées, une bactériémie contractée de l'hôpital de plus de 15 jours et sans apport de nourriture de l'extérieur doit entraîner une investigation de la cuisine hospitalière.

2.6.2 INVESTIGATION A LA DEMANDE DE CIRE

En 2012, la CIRE Bretagne a sollicité en urgence le CNRL pour investiguer un nombre inhabituellement élevé dans cette région et tenter d'en comprendre l'origine. Aucun lien microbiologique entre les souches humaines étudiées n'a été établi. La CIRE de Guadeloupe ayant également fait la même démarche mais sans urgence associée.

2.6.3 ÉTABLISSEMENT DE DONNÉES MICROBIOLOGIQUES DANS LE CADRE D'UNE REQUISITION ET D'UNE DEMANDE D'UN TRIBUNAL

Données non publiques.

2.6.4 INVESTIGATION D'UN CAS GROUPE OU EPIDEMIE

En 2012, il a été décidé d'adapter le système de surveillance en changeant la définition du dépassement de seuil pour les souches humaines avec des profils endémiques (profils humains majoritaires) pour 6 cas en 6 semaines, et de réaliser des profils *SmaI* des souches correspondantes afin d'éviter des faux-dépassements de seuils.

En Octobre 2012, un dépassement de seuil (L12/13) avec le profil endémique M-IVb-210792-210792 a été déclenché par le CNRL. Il a concerné 11 souches humaines (5 formes maternoneonatales, 3 formes neuroméningées et 3 bactériémies) dont la première est issue d'un prélèvement du 04/09/12 et la dernière du 20/11/12. Un typage moléculaire par PFGE *SmaI* montrait des profils D et Q. Le questionnaire alimentaire des patients par l'InVS par rapport à des témoins laissaient ressortir une association significative entre les patients de profil PFGE *SmaI* Q qui était la consommation d'un fromage à pâte molle à croûte fleurie au lait cru d'un producteur qui aurait été fabriqué en juillet 2012. Le producteur suspecté a fait l'objet d'une investigation par la DDPP locale mais aucun échantillon ne fut trouvé avec le profil de cette épidémie. Un typage par la méthode MLVA n'a pas permis d'approfondir la discrimination entre ces souches. Le typage par la méthode MLST a donné un ST4.

Une requête réalisée auprès des pays membres du réseau EPIS de l'ECDC a donné lieu à 7 réponses : Belgique, Danemark, Allemagne, Hongrie, Pays-Bas, Norvège et Suède. Parmi ces pays, seule la Belgique signale avoir isolé trois souches humaines similaires en profil *Ascl/ApaI*. Le CNRL a réalisé un transfert de compétence de son protocole de typage PFGE *SmaI* à son homologue belge. Les souches belges étaient de profil *SmaI* D.

Ainsi, il s'agit d'une épidémie ou d'un cas groupés de 11 cas avec une souche de *L. monocytogenes* de caractéristiques microbiologiques M-IVb-210792-210792-Q. Cette épidémie a permis de tester la cellule *Listeria* qui s'est activée selon ses procédures, a permis l'utilisation de la plateforme EPIS et à valider le changement de la surveillance pour les profils PFGE endémiques. En outre, elle a de nouveau souligné qu'en raison du décalage entre la date présumée de contamination de la population et l'apparition de cas avérés, les enquêtes sont difficiles pour retrouver l'aliment à l'origine d'une épidémie.

2.6.5 DEPASSEMENTS DE SEUILS

En 2012, la procédure de dépassement de seuil a été conforme aux différents textes de fonctionnement de la Cellule *Listeria* fixant les critères de dépassement de seuil par le CNRL (Cf. chapitre 2.1.2.). Ces textes avaient été mis à jour tout comme la nomenclature des dépassements de seuils modifiée le 3 Août 2006 et en 2012. L'ancienne nomenclature attribuait au dépassement de seuil 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) (Tableau 20).

En 2012, le CNRL a effectué 13 dépassements de seuil [2006-2011 : 9 à 16 par an ; 2011 : 9] pour des souches majoritairement du sérotype PCR IVb (85%), le plus virulent et à l'origine de nombreuses épidémies, puis du sérotype PCR IIa (15%) et du sérotype IIb (8%) (Tableau 20). A la connaissance du CNRL, aucune source commune n'a pu être identifiée avec isolement de souches du produit incriminé similaires à celles des cas humains.

Le nombre annuel de dépassement de seuils est globalement stable, mais il ne faut pas oublier que le système a changé avec la gestion des profils endémiques. Un dépassement de seuil de 2011 (L11/09) a été clôturé en 2012 et un dépassement de seuil de 2012 (L12/13) a été clôturé en 2013.

Les dépassements de seuils en 2012 ont concerné 244 souches (2011 : 127) et se décomposent de la façon suivante : 94 (2011 : 61) souches humaines, 127 (2011 : 61) souches alimentaires, 23 (2011 : 58) souches d'environnements agro-alimentaires et aucune (2011 : 0) souche vétérinaire.

→ Ainsi, 117 souches alimentaires et d'environnements agro-alimentaires d'alertes produits, soit 78% des souches alimentaires et d'environnements agro-alimentaires présentes dans des dépassements de seuils, ont été répertoriées dans les dépassements de seuils, ce qui démontre la complémentarité de ces deux modalités de surveillance, l'utilité des alertes produits et de la comparaison dès que possible des souches humaines avec les souches de ces alertes. Pour les souches de l'environnement, 9 souches de l'environnement provenant d'alertes produits DGAI uniquement ont été répertoriées dans des dépassements de seuils.

L'analyse des profils de macrorestriction d'ADN des souches de dépassement de seuils est présentée dans le chapitre 2.4.6.

Tableau 20. Synthèse des dépassements de seuils effectués par le CNRL en 2012 et rappel des dépassements de seuils de 2011.

Dépassement de seuil	Nombre de cas	Date du dépassement de seuil	Date de cloture	Caractéristiques des souches		
				Groupe PCR	Profil Ascl	Profil Apal
L11/09	7	12/12/2011	20/02/2012	IVb	151005	151005
L12/01	6	23/01/2012	27/02/2012	IVb	180110	190110
L12/02	4	07/02/2012	26/03/2012	IVb	210792	210792
L12/03	3	02/04/2012	30/04/2012	IVb	180110	190110
L12/04	6	24/04/2012	02/07/2012	IVb	270801	050506
L12/05	12	30/04/2012	14/08/2012	IVb	200792	200792
L12/06	3	07/05/2012	15/05/2012	IVb	151005	111206
L12/07	6	12/06/2012	06/08/2012	IVb	151005	151005
L12/08	3	16/07/2012	14/08/2012	IVb	01001	160602
L12/09	3	16/07/2012	06/08/2012	IIb	310801	310801
L12/10	6	06/08/2012	22/10/2012	IVb	270801	050506
L12/11*	6	01/10/2012	20/11/2012	IIa	050207	050207
L12/12	3	01/10/2012	05/11/2012	IIa	241006	241006
L12/13	26	01/10/2012	11/02/2013	IVb	210792	210792

* Nouveau profil de dépassement de seuil depuis 2012

Tableau 21. Dépassements de seuils de listériose, dépassement de seuil associé à des cas associés et des cas sporadiques, France, 2000-2012 (modifié de Goulet et coll., 2008)

Caractéristiques	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
Nombre de dépassement de seuils détectés	9	4	10	11	13	11	11	16	9	11	13	9	13
Nombre de cas appartenant à un dépassement de seuil	53	21	70	78	88	65	98	106	58	87	85	61	94
Nombre de cas n'appartenant pas à un dépassement de seuil	210	167	150	131	148	156	192	213	214	230	213	216	244

2.6.6 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 d'une DDCCRF 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 2012, 753 souches (495 en 2011, 659 en 2010, 474 en 2009, 660 en 2008, 413 en 2007, 300 souches en 2006) ont été adressées au CNRL dans le cadre des 268 alertes produits DGAI et DDPP (282 en 2011, 314 en 2010, 332 en 2009, 280 en 2008, 198 en 2007, 200 en 2006). Ces souches se répartissaient en 651 souches alimentaires et 54 souches d'environnements agro-alimentaires. Le nombre de souches par alerte produit variait de 1 à 40 souches.

Le taux d'exhaustivité de récupération des souches d'alertes déterminé est de 76% en 2012 comme en 2011, contre 81% en 2010 (62,5% en 2008 et 67% en 2009). Par l'intermédiaire d'échanges entre la DGAI, le LNRI, 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.

Comme en 2011, 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'exploitant 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 établi à la connaissance du CNRL.

Les profils *Ascl/Apal* de *L. monocytogenes* majoritairement retrouvés (>16 en 2012) dans les alertes produits sont par ordre décroissant le M-IIa-241006-241006, M-IIc-301006-301006, M-IIa-230905-230905, M-IVb-200792-200792, M-IIa-020407-020407, M-IIa-070408-090408, M-IIa-270707-270707, M-IVb-210792-210792, M-IIa-100608-230905, M-IIa-160907bis-230608bis, M-IVb-011001-160602, M-IIa-271006-050207, M-IIb-310801-310801, M-IIb-231006-310801 ont été retrouvés dans 4 dépassements de seuil et seulement 5 des profils précédents parmi les souches majoritaires humaines. Il est à noter que malgré son nombre élevé de souches par an les profils M-IIa-230905-230905 ne sont pas responsables de dépassements de seuils ou de nombreux cas humains.

2.6.7 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 2012 pour *Listeria* et lors d'inspection. Suite à la réunion de la cellule *Listeria* en 2012, les alertes produits DGCCRF comportent un numéro d'alerte DGAI ou sont stipulés comme alertes produits par les laboratoires de la DGCCRF.

En 2012, le CNRL n'a pas reçu directement les souches d'alertes produits de la DGCCRF mais principalement par l'intermédiaire du LNRI.

2.6.8 ALERTE EUROPEENNE RASFF

En 2012, le CNRL a été informé de 3 (13 en 2011) alertes européennes RASFF sur des fromages au lait cru (RASFF 2012.0772), sur du Flétan fumé (RASFF 2012.0806) et sur des fromages de la fromagerie de Jussac (RASFF 2012.1774) produits en France. Cette dernière alerte RASFF a été très médiatisée en France et à l'étranger Belgique, Luxembourg, Allemagne, Suisse ce qui a entraîné de nombreuses sollicitations du CNRL par des autorités de sécurité sanitaire des aliments et ses homologues étrangers pour répondre à des questions et procurer les profils PFGE correspondants.

2.6.9 COOPERATION DES SYSTEMES DE SURVEILLANCE

L'ensemble de ces interactions se font en concertation et accord avec l'InVS, la DGAI et la DGCCRF.

2.6.9.1 FRANCE-BELGIQUE DANS LE CADRE D'UNE EPIDEMIE BELGE

En décembre 2011, le CNR Belge a sollicité le CNRL dans le cadre d'une investigation autour d'un cas de listériose lié à la consommation d'un fromage d'origine française. Les souches isolées de l'environnement agro-alimentaire chez le producteur français se sont avérées de caractéristiques microbiologiques différentes aux souches humaines belges.

2.6.9.2 FRANCE-ALLEMAGNE

En septembre 2012, deux cas humains français montraient des caractéristiques microbiologiques rares (M-IIb-180906-180906) et similaires à des souches alimentaires isolées d'aliments produits en Allemagne qui semblaient être la source commune de contamination. Ceci a été étayé par le questionnaire alimentaire des patients et, pour un patient, à l'analyse

d'un produit ouvert de saucisses qui montrait une forte concentration de *Lm* de caractéristiques microbiologiques similaires à celles des patients. Sur cette base, une investigation a été demandée aux Autorités Allemandes. Le CNRL a procuré les profils PFGE à son homologue allemand CNR. Aucun cas allemand humain avec ces caractéristiques microbiologiques n'a été constaté.

Ainsi, le CNRL est en étroite collaboration pour échanger des profils PFGE à chaque alerte européenne RASFF où le produit français a été importé en Allemagne.

2.6.9.3 FRANCE-FINLANDE

En septembre 2012, le CNRL a participé à une investigation sur une épidémie en Finlande en explorant sa base de données pour communiquer les informations à ses collègues finlandais.

2.6.9.4 FRANCE-USA

En Avril 2012, le CDC d'Atlanta a sollicité le CNRL dans le cadre d'une investigation sur un cas de listériose avec une probabilité d'être associé avec un aliment venant d'Italie pour savoir si ces caractéristiques microbiologiques avaient déjà été observées dans les souches françaises.

Fin Juillet 2012, le CDC d'Atlanta a sollicité le CNRL dans le cadre d'une investigation sur un cas groupé de 6 cas suspecté d'être associé à la consommation d'un fromage français et présentant deux profils PFGE *Ascl/ApaI* rares qui ont été envoyés au CNRL. Un message du CDC d'Atlanta a alors été envoyé sur la plateforme EPIS. Le CNR avait observé deux cas humains avec des profils PFGE similaires. La firme productrice de ce fromage français n'avait pas présenté d'alertes produits jusqu'à présent. En réalité, il s'agissait d'un fromage Frescolina Marte Brand Ricotta Salata provenant d'Italie et non un fromage français. Une épidémie fut associée à ce produit provoquant 22 cas de listérioses sur 14 Etats, dont 20 cas hospitalisés et 4 morts. Une alerte Infosan et Rasff a été déclenchée. Le CNRL a réceptionné du CDC d'Atlanta par le réseau Pulsenet les 3 profils PFGE des souches de cette épidémie mais aucune souche humaine pour la période d'étude ne montrait ces profils PFGE. Une suspicion de circulation sur le territoire français du même lot de cet aliment avait mobilisé le CNRL pour faire une surveillance renforcée.

2.6.10 DISPOSITIF DE VEILLE ET DE SURVEILLANCE DEDIE AUX JEUX OLYMPIQUES

Dans le cadre des mouvements de population dans le Nord Pas de Calais, le CNRL a été mobilisé par l'InVS dans le cadre du dispositif de veille et de surveillance dédiés aux jeux olympiques.

2.6.11 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. Le CNRL a participé à cette révision et applique depuis ce nouveau processus ou circuit CIRE.

En 2012, sur les 104 cas de listérioses recensés comme neuroméningées auprès du CNRL par les cliniciens, **ces investigations demandées au CNRL par l'InVS ont concerné 97 cas (2010 : 55) répartis sur toute la France donc 93% (96% des cas de listérioses neuroméningées en 2011, 82% en 2010 et 2009, 77% en 2008, 62% en 2007 et 59% en 2006) des infections du système nerveux central identifiées par le CNRL en 2012.**

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, 2011 et 2012

sont respectivement 69 %, 59 %, 62%, 77%, 82%, 82%, 96% et 93% de cas neuroméningés inclus dans l'enquête contre 88 % en 2003 et 15% de cas avec prélèvements positifs en 2012 contre 41 %, 17 %, 16%, 33%, 26%, 14%, 15%, 12% en 2003, 2005, 2006, 2007, 2008, 2009, 2010 et 2011 respectivement. En 2012, parmi les 15 cas où des souches alimentaires ou de l'environnement du réfrigérateur ont été investiguées, dans 9 cas (60%), leurs caractéristiques microbiologiques étaient similaires à celles du patient.

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.

2.6.12 CONCLUSIONS

Comme pour la plupart des pays industrialisés, le système de surveillance microbiologique de la listériose en France, 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 qui semblait diminuer en 2011 après une stabilité, augmente à nouveau brutalement sans explication.

En 2012, un grand nombre de cas similaire aux années 1995 et une épidémie ont été observés. 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 et d'effectuer des recommandations de régime alimentaire pour les populations à risque.

En partenariat avec l'InVS, l'étude prospective MONALISA permettra de préciser les caractéristiques médicales des patients. Elle devrait également permettre de mieux comprendre les raisons de l'augmentation du nombre de cas observés ces dernières années.

3 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].

3.1 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 2012, 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.

3.2 COURS ET CONFERENCES SUR INVITATION

En 2012, 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 « Pathogènes alimentaires », Rennes, le 19/09/12, A. Leclercq.

- Cours sur les *Listeria*, Institut Pasteur de Lille, Cours Microorganismes et Pathogènes des Aliments, 20/06/12, A. Leclercq.

Comme décrit dans le chapitre 5, le CNRL participe à des conférences sur invitation aux niveaux national et international.

3.3 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 2012, le CNRL n'a pas accueilli de stagiaire.

3.3.1 DEMANDE D'INFORMATIONS ET DE CONSEILS

Le CNRL a reçu en 2012 environ 430 demandes d'information/an par e-mail (listeria@pasteur.fr) (~8/semaine) et 450 appels téléphoniques/an (~8/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).

3.4 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 2012, le CNRL a reçu des souches isolées de patients, adressées par des laboratoires de biologie médicale de pays pour lesquels il n'existe pas de centralisation des souches dans le cadre d'un système de surveillance (Cf. Annexe B chapitre 2.1.1.1.).

Le CNRL a également reçu 195 souches d'origine environnementale et/ou alimentaire (183 en 2011), adressées par des laboratoires d'hygiène et de contrôle des aliments pour leur identification et leur caractérisation (Cf. chapitre 2.5.1.).

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

En 2012, les responsables du CNRL ont contribué et ont participé aux réunions sur 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 2012, le CNRL a participé à la relecture et a été membre de comité de rédaction de journaux tel que PLoS pathogens, Clinical Microbiology and Infection, Research in Microbiology, Epidemiology and Infection, Journal of Food Protection, International Journal of Food Microbiology, Food Microbiology, Foodborne Pathogens and Disease, Food Analytical Methods, Journal of Analytical Methods, International Journal of Systematic and evolutionnary microbiology, etc. Dans ce cadre, environ 17 publications sur *L. monocytogenes* ont été examinées en 2012.

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*), 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 chaine 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.

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.

3.5 RETOUR D'INFORMATIONS

Compte-rendu d'analyses

La surveillance microbiologique de la listériose en France se fonde sur l'envoi volontaire et centralisé au CNRL 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-00004j-03q/ra-cnr-Listeria-2011.pdf>) et adressé à tous les institutionnels investis dans la surveillance de la listériose ainsi qu'à toute personne en faisant la demande.

En 2011-2012, 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 4.1.1. et 4.1.2.). Ils ont permis 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 co-rédigé 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). Cette fiche après validation par le CES Microbiologie et le Directeur de l'ANSES a été publiée en 2012 sur le site web de l'ANSES (<http://www.anses.fr/Documents/MIC-Fi-Listeria.pdf>).

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

L'unité de Biologie des Infections auquel le CNR des *Listeria* est affiliée, 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 de l'Unité.

Les méthodes en développement ou les recherches déjà citées dans l'annexe B chapitre 2.1.1. ne sont pas décrites dans ce chapitre.

4.1 CONTRIBUTIONS AUX ETUDES EPIDEMIOLOGIQUES

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

Responsables du projet 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 : Roussel, S., Leclercq, A., Santolini, A., Agbessi, A., Chenal-Francisque, V., Lailler, R., Lecuit, M., Pihier, N., Brisabois, A. 2012. Surveillance des *Listeria monocytogenes* dans les aliments. BEH Hors Série. 9 mai 2012 : 41-45.*

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 résidantes. 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.

4.1.2 LISTERIOSE HUMAINE : SITUATION EN FRANCE ET EN EUROPE

Responsables du projet 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 : Goulet, V., Leclercq A., Laurent E., King, L.A., Chenal-Francisque, V., Vaillant, V., Letort, M.J., Lecuit, M., et H. de Valk. 2012. Surveillance de la listériose humaine en France, 1999-2011. BEH Hors Série. 9 mai 2012 : 38-40.

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.

4.1.3 SYNTHÈSE SUR LA CONTAMINATION DES PRODUITS DE LA MER ET IMPACTE EN SANTÉ PUBLIQUE

Responsables du projet au CNRL : A. Leclercq, V. Chenal-Francisque, M. Lecuit

Coordination par A. Leclercq

En collaboration avec Sophie Roussel (ANSES), Anne Brisabois (ANSES), Jean-Christophe Augustin (ENV Alfort), Véronique Vaillant (InVS), Alain Mimouni (CTCPA), Pauline Kooh (ANSES).

Suite à la saisie de l'ANSES en 2012 par la DGS d'une demande de réévaluation des produits de la mer à risque pour les femmes enceintes dans le guide PNNS « nutrition pendant et après la grossesse » auquel le CNRL a participé, le CNRL et le LNRI ont décidé de réactualiser l'étude française de Rocourt, J., Jacquet, Ch., et A. Reilly. 2000. Epidemiology of human listeriosis and seafoods. Int. J. Food Microbiol. 62 :197-209. Le LNRI et le laboratoire de l'ANSES de Boulogne Sur Mer ont communiqué au CNRL les caractéristiques microbiologiques des souches de produits de la mer qu'ils détenaient. Une première synthèse a été réalisée par le CNRL pour répondre à la saisine de la DGS puis maintenant une étude plus exhaustive de classification des souches par produits de la mer et comparaison aux caractéristiques microbiologiques des souches humaines est en cours. Il s'agit de confirmer ou d'infirmer que comme les produits de la mer ont donné peu d'épidémies sauf les produits de saumon, leurs souches seraient potentiellement moins ou non virulentes pour l'homme.

En 2012, la cellule *Listeria* a identifié d'autres groupes à risque de listériose que les femmes enceintes que les personnes atteintes d'hémopathies et de cancers digestifs qui nécessiteraient des informations et recommandations sur le risque *Listeria*.

4.1.4 ETUDE DE LA CONTAMINATION DU BEURRE ET IMPACT EN SANTE PUBLIQUE

Responsables du projet au CNRL : A. Leclercq, M. Lecuit

Coordination par A. Leclercq

*En collaboration avec Damien Michelon (EURL *L. monocytogenes*), Hélène Bergis (EURL *L. monocytogenes*) et Annie Beaufort (EURL *L. monocytogenes*).*

Article en cours de finalisation pour Hors série de Food Control.

Suite à l'augmentation brutale du nombre de cas de listérioses en 2006, l'investigation du groupe d'experts sous l'égide de l'ANSES avait abouti à s'interroger sur le beurre comme source potentielle nouvelle de contamination. En partenariat avec l'EURL *Listeria monocytogenes*, la capacité de croissance de *Listeria* dans les beurres français par challenge test a été évaluée. Le CNRL recevant chaque année des souches d'alertes produits de *L. monocytogenes*, il a procuré deux souches à l'EURL qui a étudié leurs croissances dans cette matrice en fonction de sa composition. Il est apparu qu'il s'agissait plus d'une survie que d'une croissance et que les margarines étaient défavorables à sa croissance. Ceci répondra aux questions soulevées par le CES Biohazard de l'ANSES à ce sujet et identifie cette matrice beurre en France comme une source potentielle de *L. monocytogenes*.

4.1.5 COOPERATION DU SYSTEME DE SURVEILLANCE FRANÇAIS ET BELGE ET UTILISATION DE LA PLATEFORME EPIS DANS LE CADRE DE LA GESTION D'UNE EPIDEMIE BELGE

Responsables du projet au CNRL : A. Leclercq, V. Chenal-Francisque, M. Lecuit

Coordination par Alexandre Leclercq

Article publié : Yde, M., 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, and S. Bertrand. 2012. Usefulness of the European Epidemic Intelligence Information System in the management of an outbreak of listeriosis, Belgium, 2011. Euro Surveill 17 (38).

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.

4.1.6 OPTIMISATION DE LA SURVEILLANCE NATIONALE DE LA LISTERIOSE

Responsables du projet 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 et 2012. De nouveaux outils de surveillance basés sur l'analyse des profils PFGE sont en cours de développement au CNRL.

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

4.1.7.1 TRANSMISSION NOSOCOMIALE PROBABLE DE LISTERIOSE CHEZ DES NOUVEAUX-NES

Responsables du projet au CNRL : A. Leclercq, M. Lecuit

En collaboration avec P. Astagneau (Directeur C-CLIN Paris Nord)

Article soumis à Journal of Hospital Infection : Astagneau, P., Lazarus, C., Leclercq, A., and E. Vanhecke. Probable nosocomial transmission of listeriosis in neonates.

Il s'agit d'une description d'une transmission entre nouveaux nés dans une maternité de *Lm*.

4.1.7.2 TRAITEMENT DE LA LISTERIOSE PENDANT LA GROSSESSE : LES LEÇONS DE 4 CAS

Responsables du projet au CNRL : C. Charlier, A. Leclercq, M. Lecuit

En collaboration avec F. Goffinet (Hôpital Cochin Port Royal, Service d'obstétrique) et E. Azria (Hôpital Bichat Claude Bernard, Gynécologie-Obstétrique).

Article publié à Clinical Microbiology and Infection : Charlier, C., Goffinet, F., Azria, E., Leclercq, A., et M. Lecuit. Antimicrobial therapy for listeriosis during pregnancy: lessons from four case-reports.

Les infections à *Lm* durant la grossesse peuvent provoquer des conséquences dramatiques fetales ou néonatales. Aucun essai clinique n'a évalué les options de traitement, et les études rétrospectives sont donc importantes pour définir le traitement optimal. Nous rapportons 4 cas de listérioses materno-neonatales illustrant une gestion inadéquate du traitement thérapeutique par antibiotiques et discutons les options de traitements recommandés.

4.2 METHODES DE DIAGNOSTIC ET ATYPIES DES SOUCHES

4.2.1 CARACTERISATION DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* PAR MALDI-TOF

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

En collaboration avec le service de microbiologie de l'Hôpital Necker-Enfants Malades (O. Join-Lambert).

La spectrométrie de masse MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time-Of-Flight) 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.

Les premiers résultats publiés 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.

Le but de ce travail est d'évaluer l'intérêt de cette méthode pour la caractérisation de mutants de *L. monocytogenes* dans les gènes de virulences *ActA*, *InlA*, et *Hly* et d'approfondir la différenciation des biovars de *L. grayi*. Les résultats de ces travaux montrent qu'il n'est pas possible de caractériser les *L. grayi* au niveau du biovar et que des pics caractéristiques ou un spectre caractéristique liés à la délétion des gènes *ActA*, *InlA* et *Hly* dans les souches de *L. monocytogenes* ne sont pas observés.

4.2.2 SOUCHES DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* NON HEMOLYTIQUES

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

En collaboration avec M. Scortti et J.A. Vazquez-Boland, University of Edinburgh, Ashworth Laboratories, Edinburgh, Royaume-Uni.

Article en cours de rédaction

Le CNRL et CCOMS avait en 2007 alerté la DG SANCO de l'Union Européenne de la présence de souches de *L. monocytogenes* non hémolytiques qui posaient des problèmes aux laboratoires de routine en termes d'identification et de leur considération pour la protection des consommateurs. Le CNRL et CCOMS ont fait un bilan de ces souches dans ses collections et ont caractérisé ces souches tant sur le plan du typage moléculaire, de la phylogénie que sur les mécanismes responsables de cette perte d'hémolyse. Enfin, la virulence de ces souches a été caractérisée pour pouvoir répondre sur leur intérêt en termes de santé publique.

4.2.3 DEVELOPPEMENT D'UNE METHODE DE REFERENCE D'ISOLEMENT DE *L. MONOCYTOGENES* DANS LES SELLES ET ETUDES DE GASTROENTERITES A *L. MONOCYTOGENES*

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

Des épidémies de gastroentérites fébriles à *L. monocytogenes* (*Lm*) ont été décrites, sans toutefois qu'elles ne se compliquent nécessairement de listériose invasive. Le CNRL a étudié des cas de bactériémies, précédées d'une gastroentérite, et a tenté de mettre en évidence *Lm* dans les selles et le sang de ces patients. En 2008, les selles prélevées pendant la période de

gastroentérite fébrile de 3 patients ayant déclaré une bactériémie ont été étudiées. Ceci a permis l'isolement par la méthode d'inoculation directe sur gélose ALOA™ de *Lm*. Cette méthode simple et efficace d'isolement de *Lm* pourrait donc être utilisée pour mettre en évidence *Lm* à partir de coprocultures.

Pour chaque patient étudié, la souche de *Lm* isolée dans les selles au cours de l'épisode de gastroentérite fébrile était similaire à celle responsable de la bactériémie, démontrant que la phase intestinale de l'infection conduisant à une listériose invasive peut être symptomatique. En cas de gastroentérite fébrile où aucune bactérie entéropathogène classique n'est détectée (*Campylobacter*, *Yersinia*, *Salmonella*, *Shigella*, EPEC), la recherche et la mise en évidence de *Lm*, notamment chez les personnes à risque de listériose, permettraient un traitement précoce susceptible de prévenir les complications graves, notamment neurologiques et fœtales, de la listériose.

En 2012, cette approche a été complétée par la caractérisation de ces souches de gastroentérites pour estimer leur virulence.

4.2.4 EVALUATION DES *L. MONOCYTOGENES* 4AB

Responsables du projet au CNRL : A. Leclercq - M. Lecuit

En collaboration avec le pôle d'identification biologique de la CIBU (A. Le Fleche) et l'Environmental Research Institute and Department of Microbiology, University College Cork, Ireland (M. Achtman)

Suite à la constatation que des laboratoires français et étrangers avaient des difficultés à sérotyper les souches de *L. monocytogenes* de sérovar 4ab en raison de la mauvaise qualité du sérum IX des kits, le CNRL s'est posé la question de l'appartenance réelle de ces souches dites 4ab à l'espèce *monocytogenes* et si le sérovar était correctement déterminé. 30 souches dites *L. monocytogenes* 4ab ont été étudiées et ne sont pas de l'espèce *monocytogenes*, mais *innocua*, ce qui explique les difficultés de sérotypage : le séquençage de 1400 pb du gène de l'ADNr16s a permis d'identifier ces souches comme appartenant à l'espèce *L. innocua*. Une seule souche du CNRL a été caractérisée comme une vraie *L. monocytogenes* 4ab et est proposé comme nouvelle souche de référence. En 2012, le CNRL a investigué de nouvelles souches potentiellement *L. monocytogenes* 4ab de la collection SLCC procurées par l'University College Cork.

Une note corrective et d'actualisation du schéma de sérotypage classique par agglutination est en cours de rédaction.

4.3 ETUDE DE LA VIRULENCE

4.3.1 ETUDE DE ACTA DE *L. MONOCYTOGENES* ET BIOFILMS

Personne participant au projet au CNRL : V. Chenal-Francisque - M. Lecuit

Article Publié : Travier, L., S. Guadagnini, E. Gouin, A. Dufour, V. Chenal-Francisque, P. Cossart, J. C. Olivo-Marin, J. M. Ghigo, O. Disson, and M. Lecuit. 2013. ActA Promotes Listeria monocytogenes Aggregation, Intestinal Colonization and Carriage. PLoS Pathog 9:e1003131.

Listeria monocytogenes (Lm) is a ubiquitous bacterium able to survive and thrive within the environment and readily colonizes a wide range of substrates, often as a biofilm. It is also a facultative intracellular pathogen, which actively invades diverse hosts and induces listeriosis. So far, these two complementary facets of *Lm* biology have been studied independently. Here we demonstrate that the major *Lm* virulence determinant ActA, a PrfA-regulated gene product enabling actin polymerization and thereby promoting its intracellular motility and cell-to-cell spread, is critical for bacterial aggregation and biofilm formation. We show that ActA mediates *Lm* aggregation via direct ActA-ActA interactions and that the ActA C-terminal region, which is not involved in actin polymerization, is essential for aggregation in vitro. In mice permissive to orally-acquired listeriosis, ActA-mediated *Lm* aggregation is not observed in infected tissues but occurs in the gut lumen. Strikingly, ActA-dependent aggregating bacteria exhibit an increased ability to persist within the cecum and colon lumen of mice, and are shed in the feces three order of magnitude more efficiently and for twice as long than bacteria unable to aggregate. In conclusion, this study identifies a novel function for ActA and illustrates that in addition to contributing to its dissemination within the host, ActA plays a key role in *Lm* persistence within the host and in transmission from the host back to the environment.

Le CNRL étudie toutes les souches atypiques du CNRL flocculant ou donnant des biofilms ou impliqués dans des infections particulières où un biofilm est suspecté de jouer un rôle.

4.3.2 ETUDE DE SOUCHES HYPOVIRULENTES ET AVIRULENTES

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

Coordination de S. ROCHE (INRA UR 918 Pathologie infectieuse et Immunologie de Tours)

Article publié : Roche, S. M., O. Grepinet, A. Kerouanton, M. Ragon, A. Leclercq, S. Temoin, B. Schaeffer, G. Skorski, L. Mereghetti, A. Le Monnier, and P. Velge. 2012. Polyphasic characterization and genetic relatedness of low-virulence and virulent Listeria monocytogenes isolates. BMC Microbiol 12:304.

Currently, food regulatory authorities consider all *Listeria monocytogenes* isolates as equally virulent. However, an increasing number of studies demonstrate extensive variations in

virulence and pathogenicity of *L. monocytogenes* strains. Up to now, there is no comprehensive overview of the population genetic structure of *L. monocytogenes* taking into account virulence level. We have previously demonstrated that different low-virulence strains exhibit the same mutations in virulence genes suggesting that they could have common evolutionary pathways. New low-virulence strains were identified and assigned to phenotypic and genotypic Groups using cluster analysis. Pulsed-field gel electrophoresis, virulence gene sequencing and multi-locus sequence typing analyses were performed to study the genetic relatedness and the population structure between the studied low-virulence isolates and virulent strains. These methods showed that low-virulence strains are widely distributed in the two major lineages, but some are also clustered according to their genetic mutations. These analyses showed that low-virulence strains initially grouped according to their lineage, then to their serotypes and after which, they lost their virulence suggesting a relatively recent emergence. Loss of virulence in lineage II strains was related to point mutation in a few virulence genes (*prfA*, *inlA*, *inlB*, *plcA*). These strains thus form a tightly clustered, monophyletic group with limited diversity. In contrast, low-virulence strains of lineage I were more dispersed among the virulence strains and the origin of their loss of virulence has not been identified yet, even if some strains exhibited different mutations in *prfA* or *inlA*.

4.4 TAXONOMIE

4.4.1 NOUVELLES ESPECES

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.

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

4.5.1 LA DIVERSITE ENVIRONNEMENTALE DES LISTERIA : PROJET TRANSVERSAL DE RECHERCHE CNRL/LNR

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

Projet financé par l'Institut Pasteur et l'ANSES dans le cadre des échanges scientifiques CNR/LNRI

En collaboration avec la plate-forme de génotypage des pathogènes et santé publique PF8 (S. Brisse & V. Caro) et avec le LNR de l'ANSES (A. Brisabois et S. Roussel).

Une étude est en cours sur la diversité environnementale des *Listeria* et la dynamique des populations des *Listeria*. Il s'agit d'estimer dans l'environnement la diversité existante et de la comparer à celle des cas humains ou des aliments afin de mieux comprendre la dynamique des populations, pour tester l'hypothèse qu'il existe un filtre entre souches humaines et souches environnementales ou alimentaires. Outre le développement d'outils pour la surveillance nationale, ce projet permettra de relier le génotype de souches à leur potentiel de virulence et épidémique en cas d'alertes.

Un projet transversal (IP/ANSES) de recherche entre le CNRL et le laboratoire National de Référence des *L. monocytogenes* (LNRI) : « Phylogenetic structure of clones of *Listeria monocytogenes* from clinical food and environmental sources », est financé depuis Avril 2010 pour une période de deux ans.

L'objectif général de ce projet est de tester l'hypothèse que les génotypes de *L. monocytogenes* qui sont les plus fréquents parmi les isolats cliniques ont une capacité accrue à infecter l'homme et causer une listériose, vs. l'hypothèse alternative que des génotypes ne sont pas plus pathogènes mais sont simplement plus fréquents et répandus dans les aliments.

Les objectifs spécifiques sont :

- Définir avec une grande exactitude les relations phylogénétiques entre les souches cliniques et isolats alimentaires provenant de différents animaux (porcs, produits de la mer, etc.) ;
- Déterminer la prévalence des génotypes étroitement définis dans les échantillons alimentaires et cliniques ;
- Améliorer la compréhension des bases génétiques de la virulence des génotypes de *L. monocytogenes* par un séquençage complet de génome d'isolats représentatifs.

La stratégie d'étude est la suivante :

- Cartographier les données PFGE disponibles pour 4000 isolats dans un réseau phylogénétique fondé sur la MST, qui définit la diversité clonale de *L. monocytogenes* ;
- Déterminer la séquence complète de génômes d'isolats représentatifs de familles clonales définies par MLST à partir de différentes origines. Cette stratégie se fonde sur la base exhaustive de données françaises des souches de *L. monocytogenes* d'origine alimentaire et clinique de 2000 à 2009. Une base de données (6500 souches alimentaires) est hébergée au LNR et une seconde base (18000 souches humaines et alimentaires) est hébergée au CNRL. Ces bases de données contiennent des sources d'informations sur les isolats parmi lesquelles (pour un sous-ensemble d'isolats) les données PFGE obtenues avec les enzymes *Ascl* et *Apal*.

En avril 2012, ce projet s'est achevé et les données sont en cours d'exploitation.

4.6 ETUDE DE LA RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES

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

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.

4.7 PROJETS COLLABORATIFS

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

- avec des entités de l'Institut Pasteur :
 - Unité des Interactions Bactéries Cellules (P. Cossart): Travaux sur la virulence des *Listeria* et sur de nouveaux anticorps spécifiques de *L. monocytogenes*,
 - Plate-forme de Génotypage des Pathogènes et Santé Publique (S. Brisse – V. Caro): Travaux de mise au point de nouvelles méthodes de typage moléculaire,
 - Unité des agents antibactériens (P. Courvalin): Etude moléculaire des résistances aux agents anti-*Listeria* et confirmation des résistances constatées au CNR des *Listeria* ;
- d'autres équipes (Hôpitaux Necker-Enfants malades et Cochin (APHP), INRA, CDC d'Atlanta, Université Catholique de Porto, etc.).

4.8 CONCLUSIONS

Comme l'illustre ce chapitre du rapport, la recherche constitue une part importante de notre activité, complémentaire des activités liées à la surveillance de la listériose humaine. Cette recherche se nourrit de notre activité de référence et vient également guider celle-ci. Elle comporte un volet de recherche appliquée, qui découle directement de notre activité de référence, et vise à améliorer les aspects techniques et diagnostiques. S'y accole un volet plus fondamental, développé en lien avec la PF8, qui dérive de notre activité de caractérisation des souches *in vitro*, au plan génotypique et phénotypique: il vise à mieux comprendre le profil évolutif et la variabilité intra- et inter-spécifique de *L. monocytogenes*. Cette approche devrait nous permettre d'identifier des spécificités des souches cliniques par rapport aux souches environnementales et notamment alimentaires.

Enfin, un troisième volet concerne les aspects physiopathologiques et sont développés dans l'esprit d'un continuum le plus concret possible entre activités cliniques, microbiologiques, épidémiologiques et fondamentales.

5 LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

5.1 PUBLICATIONS NATIONALES

- Roussel S., Leclercq, A., Santolini, A., Agbessi, A., Chenal-Francisque, V., Lailler, R., Lecuit, M., Pihier, N., Brisabois, A. 2012. **Surveillance des *Listeria monocytogenes* dans les aliments**. BEH Hors Série. 9 mai 2012 : 41-45.
- Goulet, V., Leclercq, A., Laurent E., King, L.A., Chenal-Francisque, V., Vaillant, V., Letort, M.J., Lecuit, M., et H. de Valk. 2012. **Surveillance de la listériose humaine en France, 1999-2011**. BEH Hors Série. 9 mai 2012 : 38-40.
- Coste, J. F., V. Duval, Y. Nguyen, T. Guillard, L. Brasme, C. David, C. Strady, M. Lecuit, and C. de Champs. 2012. **Unusual location of a brain abscess due to *Listeria monocytogenes***. Pathologie-biologie **60**:e45-8.
- Marc Lecuit, Caroline Charlier. **Listériose**. Chapitre 67. Pilly Edition 2014.

5.2 PUBLICATIONS INTERNATIONALES

- Yde, M., 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, and S. Bertrand. 2012. **Usefulness of the European Epidemic Intelligence Information System in the management of an outbreak of listeriosis, Belgium, 2011**. Euro Surveill **17**(38).
- Farfour, E., J. Leto, M. Barritault, C. Barberis, J. Meyer, B. Dauphin, A. S. Le Guern, A. Lefleche, E. Badell, N. Guiso, A. Leclercq, A. Le Monnier, M. Lecuit, V. Rodriguez-Nava, E. Bergeron, J. Raymond, S. Vimont, E. Bille, E. Carbonnelle, H. Guet-Revillet, H. Lecuyer, J. L. Beretti, C. Vay, P. Berche, A. Ferroni, X. Nassif, and O. Join-Lambert. 2012. **Evaluation of the Andromas MALDI-TOF MS system for identification of aerobically growing Gram-positive Bacilli**. J Clin Microbiol. **50**(8):2702-7.
- 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.
- Archambaud, C., M. A. Nahori, G. Soubigou, C. Becavin, L. Laval, P. Lechat, T. Smokvina, P. Langella, M. Lecuit, and P. Cossart. 2012. **Impact of lactobacilli on orally acquired listeriosis**. Proc Natl Acad Sci U S A **109**:16684-9.
- Disson, O., and M. Lecuit. 2012. **Targeting of the central nervous system by *Listeria monocytogenes***. Virulence **3**:213-21.

- Respaud, R., S. Grayo, E. Singlas, S. Dubouch, A. Le Monnier, and M. C. Lott. 2012 **High-performance liquid chromatography assay for moxifloxacin in brain tissue and plasma: validation in a pharmacokinetic study in a murine model of cerebral listeriosis.** J Anal Methods Chem 2012:436349.
- Mailles, A., De Broucker, T., Costanzo, P., Martinez-Almoyna L, Vaillant V, Stahl JP, Bebear C, Bernillon P, Brouard C, de Broucker T, Cua E, Dabernat H, Floret D, Lecuit M et al. 2012. **Long-term outcome of patients presenting with acute infectious encephalitis of various causes in France** Clin Infect Dis. **54**(10): 1455-64.
- Travier, L., S. Guadagnini, E. Gouin, A. Dufour, V. Chenal-Francisque, P. Cossart, J. C. Olivo-Marin, J. M. Ghigo, O. Disson, and M. Lecuit. 2013. **ActA Promotes *Listeria monocytogenes* Aggregation, Intestinal Colonization and Carriage.** PLoS Pathog **9**:e1003131.
- Roche, S. M., O. Grepinet, A. Kerouanton, M. Ragon, A. Leclercq, S. Temoin, B. Schaeffer, G. Skorski, L. Mereghetti, A. Le Monnier, and P. Velge. 2012. **Polyphasic characterization and genetic relatedness of low-virulence and virulent *Listeria monocytogenes* isolates.** BMC Microbiol **12**:304.

5.3 CHAPITRES DE LIVRES

- Doran K Baerjee, A., O. Disson, and M. Lecuit. 2012. Crossing host barriers, Bacterial Pathogens: Concepts/Mechanisms. **Bacterial Pathogenesis. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Editor P Cossart, S Maloy, 2012, in press**

5.4 COMMUNICATIONS NATIONALES

- **Journée Départementale du Département Infections et Epidémiologie.** Institut Pasteur, Paris. 27-28 Septembre 2012. Poster. V. Chenal-Francisque, L. Diancourt, T. Cantinelli, V. Passet, H. Bracq-Dieye, A. Leclercq, C. Pourcel, S. Brisse and M. Lecuit. **Assessing the genetic diversity of *Listeria monocytogenes* through Multiple Locus Variable of Tandem Repeat Analysis (MLVA) - Evaluation of MLVA as a molecular subtyping method for *Listeria monocytogenes*.** Abstract P16 page 62.
- **5^{ième} colloque du "Club des Belles souris".** Institut Pasteur, Paris. 5 avril 2012. Oral. M. Lecuit. **Humanized mouse models for listeriosis.**
- **Seminar series.** Institut Fédératif de Recherche 48, Marseille. **13 Avril 2012.** Oral. M. Lecuit. ***Listeria monocytogenes* crossing of host barriers.**
- **Seminar series.** UMR 722 Inserm Universités Paris Diderot et Paris Nord, Ecologie et évolution des microorganismes, Paris. **3 Mai 2012.** Oral. M. Lecuit. ***Listeria monocytogenes* crossing of host barriers.**

- Colloquium "Seeing is believing". Collège de France, Paris. 4 Juin 2012. Oral. M. Lecuit. Revisiting the cell biology of *Listeria monocytogenes* infection by tissue imaging.

5.5 COMMUNICATIONS INTERNATIONALES

- **6th Workshops of the NRLs for *Listeria monocytogenes***. 28-30 Mars 2012. Maisons-Alfort. Marc Lecuit et Sylvain Brisse. « *Listeria monocytogenes* clonal diversity: everything is everywhere, so let's talk the same language ».
- **6th Workshops of the NRLs for *Listeria monocytogenes***. 28-30 Mars 2012. Maisons-Alfort. Marc Lecuit et Viviane Chenal Francisque. « MLVA evaluation as a subtyping method for *Listeria monocytogenes* ».
- **Symposium "Real time analysis of host-pathogen interactions", 112th American Society for Microbiology (ASM) General Meeting**. 19 Juin 2012. San Francisco, CA / USA. Marc Lecuit. *Listeria monocytogenes* crossing of the intestinal barrier: *in vivo* imaging of a silent invasion.
- **Spetses summer school on pathogen-host-interactions of major animal infectious diseases and zoonoses**. 10 Septembre 2012. Spetses Island, Greece. Marc Lecuit. *Listeria monocytogenes* crossing of host barriers.
- **11th Awaji International Forum on Infection and Immunity**. 15 Septembre 2012. Awaji Yumebutai International Conference Center, Awaji City, Hyogo, Japan. Marc Lecuit. *Listeria monocytogenes*, a silent invader.

5.6 CONFERENCES SUR INVITATIONS

- **Séminaire du Centre pour l'Infection & Immunologie de Lille**. 11 Octobre 2011. Lille. Marc Lecuit. « *Listeria monocytogenes*, a silent invader ».

5.7 PRESENCE DANS LES MEDIAS

- Tournage d'un reportage pour la chaîne NRJ12 pour la série « **Les énigmes de la médecine** » : *Listeria* et listériose.

6 CONCLUSIONS

En 2012, le nombre de cas de listériose déclarés en France a été de 343 cas (+18% par rapport à 2011). Cette augmentation reflète principalement l'augmentation significative des formes neuroméningées par rapport aux années 2006-2011 au second semestre de l'année 2012, sans explication à ce jour. Le taux de létalité de la listériose humaine est de 25 à 30% et le taux d'hospitalisation est supérieur à 93% soulignant l'importance de la surveillance de la listériose humaine. En septembre 2012, une épidémie de 11 cas a été détectée sans identification formelle de la source alimentaire. Le nombre total de souches humaines et non humaines réceptionnées au CNR a augmenté de 40% par rapport à l'année précédente. Le CNRL et ses partenaires de la cellule interministérielle *Listeria* ont publié deux synthèses dans le bulletin épidémiologique hebdomadaire concernant ses activités de surveillance humaines et alimentaires. 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'alertes européennes et internationales.

En 2012, le CNRL a participé à la nouvelle surveillance microbiologique moléculaire au niveau européen en tant que participants aux programmes TESSY (The European Surveillance System) et ELITE (European *Listeria* Typing Exercise). Il a également initié, en tant que centre collaborateur de l'OMS, un réseau international WHO des Centres Nationaux de Référence des *Listeria* regroupant à ce jour 41 pays.

Le CNR des *Listeria* participe 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 CNR a finalisé le développement et la validation d'une méthode MLVA (*Multi Loci Variable Number tandem Repeats Analysis*) pour le typage et le criblage rapide des souches.

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 également 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 également finalisé une étude phylogénétique par Multi-virulence-Locus Sequence Typing (MvLST) afin d'étudier l'intérêt de la prise en compte de la séquence de gènes impliqués dans la virulence pour le typage MLST.

Afin de mieux caractériser les formes cliniques de la listériose, de préciser les modalités diagnostiques et thérapeutiques et d'identifier des facteurs de risque et pronostiques, l'étude prospective cas-témoins MONALISA (clinical trials NCT01520597) a été initiée fin 2009 et se poursuit jusqu'en juillet 2013. Financée principalement par le programme hospitalier de recherche clinique national (PHRC), elle va permettre d'avancer dans la compréhension de cette infection sévère. A ce jour, 356 cas de septicémies, 186 cas

d'infections du système nerveux central et 91 cas d'infections materno-fœtales ont été inclus. Cette étude cas-témoins permettra également d'évaluer l'intérêt de nouvelles techniques diagnostiques.

En lien avec l'Unité de Biologie des Infections, 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 (caractérisation des 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. Multistate outbreak of listeriosis associated with Jensen Farms cantaloupe-United States, August-September 2011. *Morb. Mort. Week. Rep.* 2011, 60, 1357-1358.
- 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 2012. Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. SOUSSY C.J. (ed.). SFM, 2012, Paris.
- Anonyme. REMIC européen: Référentiel en microbiologie médicale (bactériologie et mycologie). SFM, 2012, 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Gilmour, M. W., M. Graham, G. Van Domselaar, S. Tyler, H. Kent, K. M. Trout-Yakel, O. Larios, V. Allen, B. Lee, and C. Nadon. 2010. High-throughput genome sequencing of two *Listeria monocytogenes* clinical isolates during a large foodborne outbreak. *BMC Genomics* 11:120.
- 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., Miegerville A.-F., Catimel B., Huynh G., Courtieu A.L., Rocourt J. La listériose humaine en France en 1991, 1992 et 1993 - Bilan à

- partir de souches adressées aux centres nationaux de référence. Bull. Epidémiol. Hebdom., 1994, 28, 123-125.
- Jacquet Ch., Rocourt J. La listériose humaine en France en 1999 - Données du Centre National de Référence. Feuill. 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*. Feuill. 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.
- 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.
- 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.
- McLaughlin 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.
- McLaughlin J., Hall S.M., Velani S.K., Gilbert R.J. Human listeriosis and paté - A possible association. Brit. Med. J., 1991, 303, 773-775.
- McLaughlin 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., Miegerville A.F., Catimel B., Courtieu, A.L. La listériose en France en 1990 – Etude à partir des souches adressées au Centre National de Référence. Bull. Epidémiol. Hebdom., 1992b, 16, 69-70.
- Salamina G., Dalle Donne E., Niccolini A., Poda G., Cesaroni D., Bucci M., Fini R., Maldini, M., Schuchat A., Swaminathan B., Bibb W., Rocourt, J., Binkin N., 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.
- Scortti, M., L. Lacharme-Lora, M. Wagner, I. Chico-Calero, P. Losito, and J. A. Vazquez-Boland. 2006. Coexpression of virulence and fosfomycin susceptibility in *Listeria*: molecular basis of an antimicrobial in vitro-in vivo paradox. Nat Med 12:515-7.
- Seeliger H.P.R., Höhne K. Serotyping of *Listeria monocytogenes* and related species. In : Methods in Microbiology, Bergan, T. and Norris, J., ed., 1979; Academic Press, New York, 33-48.
- Seeliger H.P.R., Rocourt J., Schrettenbrunner A., Grimont P.A.D., Jones D. *Listeria ivanovii* sp. nov. Int. J. System. Bacteriol., 1984, 34, 336-337.
- Sethi S.K., Ghafoor M.A., Vandepitte J. Outbreak of neonatal listeriosis in a regional hospital in Kuwait. Eur. J. Pediat., 1989, 148, 368-70.
- Sperry K.E., Kathariou S., Edwards J.S., Wolf L.A. Multile-Locus Number Tandem Repeat Analysis as a subtyping tool for *Listeria monocytogenes*. J. Clin. Microbiol. (Sous presse)
- Stamm A.M., Dismukes W.E., Simmons B.P., Cobbs C.G., Elliott A., Budrich P., Harmon J. Listeriosis in renal transplant recipients : report of an outbreak and review of 102 cases. Rev. Infect. Dis., 1982, 4, 665-682.
- Swaminathan, B.; Hunter, S. B.; DeSmarchelier, P. M.; Gerner-Smidt, P.; Graves, L. M.; Harlander, S.; Hubner, R.; Jacquet, Ch.; Pedersen, B.; Reineccius, K.; Ridley, A.; Saunders, N. A., and Webster, J. A. WHO-sponsored international collaborative study to evaluate methods for

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

Swanithan, B., et Gerner-Smidt, P. The epidemiology of human listeriosis. *Microbes and Infection*, 2007, 10, 1236-1243.

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.

ANNEXE A : Organisation du CNR

1 ORGANISATION DU CNR

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). Depuis 2008, il est rattaché au Groupe Microorganismes et Barrières de l'hôte qui a été transformé en janvier 2013 en Unité de Biologie des Infections.

L'Unité de Biologie des Infections 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.

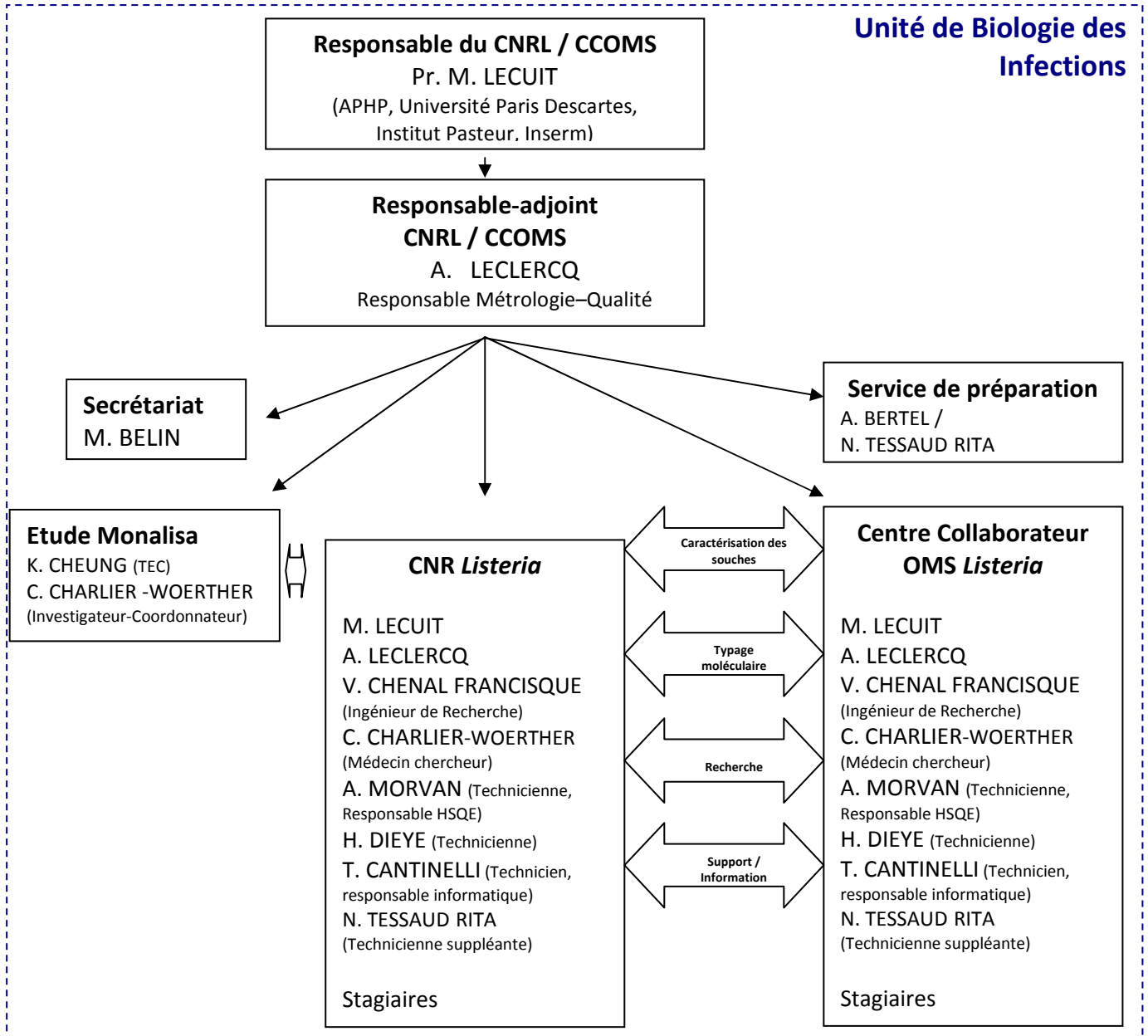
Le CNRL est également en contact constant avec un réseau de 700 biologistes français et l'ensemble des laboratoires vétérinaires départementaux, de la DGCCRF, des laboratoires privés d'hygiène des aliments (environ 262 correspondants).

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 22 et Figure 22.

Figure 22. Organigramme Général du Personnel du CNR *Listeria*



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 l'Unité de Biologie des Infections, 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).

Tableau 22. Personnel statutaire de l'Institut Pasteur affecté au CNR des *Listeria*

Nom – Prénom	Libellé Emploi	% Act*.	% Section Bud.**	Financement Quote-Part	ETP***
LECLERCQ Alexandre	Cadre A confirmé – Responsable-Adjoint	100,00	70,00	INVS	0,70
CHENAL FRANCISQUE Viviane	Ingénieur 2	100,00	100,00	INVS	0,30
MORVAN Anne	Technicienne supérieure de laboratoire Échelle 6	100,00	90,00	INVS	0,90
CANTINELLI Thomas	Technicien supérieur de laboratoire Échelle 5	100,00	80,00	INVS	0,80
DIEYE Hélène	Technicienne supérieure de laboratoire Échelle 5	100,00	90,00	INVS	0,90
BELIN Martine	Secrétaire Échelle 4	50,00	50,00	IP	0,50
RITA TESSAUD Nathalie	Aide de Laboratoire Échelle 3	80,00	40,00	IP	0,32
BERTEL Arnaud	Aide de Laboratoire Échelle 3	100,00	35,00	IP	0,50
TOTAL Equivalent Temps Plein (ETP)					4,92

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

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

***ETP Equivalent Temps Plein.

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*).

1.2 LOCAUX

Laboratoires et bureaux:

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

Les pièces suivantes sont dédiées à l'activité du CNRL ainsi qu'au Centre collaborateur de l'OMS *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 la collection de microorganismes du CNRL.

Pièces partagées du CNRL:

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

L'ensemble de ces pièces suit le processus de la marche en avant du propre vers le sale. Les pièces critiques (collection, etc.) sont sous surveillance de température et ont été incorporées au plan de continuité d'activité de l'Institut Pasteur.

→ L'année 2013 sera marquée par le déménagement du CNRL dans de nouveaux locaux au sein 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,
- 2 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 puis au référentiel NF EN ISO CEI 17025 :2005.

Cette démarche particulière du CNRL a rejoint une démarche d'harmonisation des systèmes de management qualité des Laboratoires de Références et d'Expertise (CNR et CIBU) de 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, le Service Qualité, Environnement et Développement Durable (QE-DD) 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 au COFRAC des actes de candidatures pour l'accréditation le 31/10/2012 en vue de l'obtention de l'accréditation partielle avant le 31 mai 2013 pour Laboratoires de Références et d'Expertise (CNR et CIBU) de l'Institut Pasteur) et complète (avant le 01/11/2016) 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* et *Apal* (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 2012

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.

La gestion des non-conformités et réclamations est réalisée avec le logiciel Kalilab.

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 a établi en 2012 son dossier de validation de sa méthode d'identification biochimique des souches en conformité avec les référentiels COFRAC de validation en santé humaine.

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.

Le CNRL a participé 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. Il a obtenu 100% de réussite. Le CNR participe en Janvier 2013 à un essai d'intercomparaison organisé par le Statens Serum Institut de Copenhague qui est mandaté pour cette mission par l'ECDC.

Le CNRL et le CCOMS 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.

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.

ANNEXE B : ACTIVITES D'EXPERTISE DU CNR LISTERIA

2 ACTIVITES D'EXPERTISE DU CNR DES LISTERIA

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

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

2.1.1 IDENTIFICATION ET CARACTERISATION DES SOUCHES DE *LISTERIA*

2.1.1.1 METHODES ET MARQUEURS EPIDEMIOLOGIQUES DISPONIBLES

Le CNRL reçoit les souches isolées de patients par les biologistes médicaux [laboratoires publics hospitaliers et plus rarement de Laboratoires d'Analyses de Biologie Médicale (LABM) privés] 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 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. 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. En cas de difficultés de détermination de l'espèce de *Listeria*, le séquençage du gène *iap* est réalisé.

- **Détermination du sérotype 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 (*Lmo1118*, *Lmo0737*, *ORF2110*, *ORF2819*) spécifiques de *L. monocytogenes* permettant de déterminer le « sérotype 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 sérotype 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 dépassement de seuil ou une alerte ce qui a été approuvé par la cellule *Listeria* le 23/04/2007; (ii) dans le cas d'un dépassement de seuil 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 ou pour approfondir une investigation dans le cadre de la surveillance nationale:

- **Typage rapide de souches.** Sur la base du schéma MLVA que le CNRL a établi et validé, les souches d'intérêt de *L. monocytogenes* peuvent être typées et leur appartenance à un MLVA Type déterminée rapidement. Il s'agit d'un outil de criblage utile en cas d'épidémies.

- **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.

2.1.1.2 TECHNIQUES DEVELOPPEES EN 2012

En 2012, le CNRL a poursuivi le développement de nouvelles techniques ou méthodes.

2.1.1.3 METHODES EN DEVELOPPEMENT

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

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

Collaboration avec la plate-forme de génotypage des pathogènes et santé publique PF8 de l'Institut Pasteur (S. Brisse, V. Caro) et C. Pourcel (Institut de génétique et Microbiologie, Université Paris-Sud, Orsay).

*Article publié à Journal of Clinical Microbiology : Chenal-Francisque, V., Diancourt, L., Cantinelli, T., Passet, V., Tran-Hykes, C., Bracq-Dieye, H., Leclercq, A., Pourcel, C., Lecuit, M., and S. Brisse. An optimized MLVA assay and its complementarity with PFGE and MLST for *Listeria monocytogenes* clone identification and surveillance.*

Populations of the foodborne pathogen *Listeria monocytogenes* are genetically structured into a small number of major clonal groups, some of which have been implicated in multiple outbreaks. The goal of this study was to develop and evaluate an optimized multilocus variable number of tandem repeat (VNTR) analysis (MLVA) subtyping scheme for strain discrimination and clonal group identification. We evaluated 18 VNTR loci and combined the 11 best ones into two multiplexed PCR assays (MLVA-11). A collection of 255 isolates representing the diversity of clonal groups within phylogenetic lineages 1 and 2, including representatives of epidemic clones, were analyzed by MLVA-11, multilocus sequence typing (MLST) and pulse field gel electrophoresis (PFGE). MLVA-11 was less discriminatory than PFGE, except for some clones, and was unable to distinguish some epidemiologically unrelated isolates. Yet it distinguished all major MLST clones and therefore constitutes a rapid method to identify epidemiologically relevant clonal groups. Given its high reproducibility and high-throughput, MLVA represents a very attractive first-line screening method to alleviate PFGE workload in outbreak investigations and listeriosis surveillance

↳ Il conviendra ensuite de valider cette nouvelle méthode par essai interlaboratoire européen, d'effectuer un transfert de technologie et d'investiguer son utilisation pour améliorer la surveillance microbiologique de la listériose en France.

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 a donc décidé de mettre en place une étude prospective cas-témoins 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. Une étude cas-témoins (MONALISA) dans le cadre du programme hospitalier de recherche clinique (PHRC), sous la direction du Pr. M. Lecuit et coordonné par le Dr C. Charlier, Praticien Hospitalo-Universitaire du service des Maladies infectieuses de l'hôpital Necker-Enfants malades a été acceptée en 2009. Il implique le CNRL, l'InVS et le service des Maladies infectieuses et tropicales de l'hôpital Necker-Enfants malades. Il est brièvement présenté ci-après. Cette étude a commencé en Novembre 2009 et se terminera en Juillet 2013. A ce jour, plus de 356 cas de septicémie, de 186 cas d'infection du système nerveux central et de 91 cas d'infection materno-fœtales ont été inclus.

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).

Objectif principal du projet: Étudier les facteurs de risque de survenue d'une listériose (cliniques, biologiques et génétiques), étudier les facteurs pronostiques de mortalité liés à la listériose.

Objectifs secondaires du projet:

- Décrire la présentation actuelle clinique, biologique et radiologique de la listériose et son histoire naturelle ;
- Décrire les pratiques thérapeutiques dans les trois formes de l'infection.

Étude ancillaire : Évaluer des outils diagnostiques fondés sur la sérologie et la PCR et identifier d'éventuelles prédispositions génétiques à cette infection.

Méthodologie :

- Étude prospective nationale multicentrique de cohorte avec étude cas /témoin emboîtée.
- Volet clinique : recueil de données cliniques, biologiques, radiologiques et un interrogatoire alimentaire.
- Volet biologique : constitution d'une bibliothèque comportant un échantillon de sang total, de sérum, de LCR et de tissu quand il sera disponible.

Critères d'inclusion :

- Cas : patient avec une listériose prouvée (culture positive du sang, LCR, placenta, ou de tout autre site normalement stérile, ou d'un prélèvement fœtal/néonatal) diagnostiquée dans les 14 jours précédant l'inclusion.
- Témoins : patient présentant un terrain et un tableau clinique compatible avec une listériose : immunodéprimé fébrile, patient présentant un tableau neurologique fébrile, femme enceinte fébrile et n'ayant pas de listériose (hémocultures négatives et PCR négative si réalisée).

Durée de participation : cas : 3 mois, témoins : un jour (celui de l'inclusion).

Chronologie de l'étude :

J0 : pour tous les malades : évaluation clinique et prélèvement biologique sanguin

M3 : pour les patients adultes : évaluation clinique de l'évolution et des séquelles de l'infection

Nombre de sujets nécessaires :

100 patients cas / forme d'infection : materno-néonatale, septicémique et neurologique (total 300) 200 patients témoins / forme d'infection : materno-néonatale, septicémique et neurologique (total 600)

Perspectives :

Cette étude, la première réalisée prospectivement dans le cadre de cette infection devrait permettre :

- d'améliorer la prise en charge thérapeutique de la listériose ;
- de caractériser des facteurs de risque de survenue et d'évolution (pronostic) de cette infection ;
- de constituer une bibliothèque permettant d'évaluer ultérieurement de nouveaux outils diagnostiques des infections à *L. monocytogenes* dont la sérologie.

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 est sollicité chaque année 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 pour pouvoir prétendre à la détection et dénombrement des *Listeria* spp.

Lors de l'établissement de son dossier de validation de sa méthode d'identification pour son accréditation ISO 15189, le CNR a précisé à la firme bioMérieux que la galerie API *Listeria* n'était pas validée sur l'ensemble des nouvelles espèces de *Listeria*. Le CNRL a signalé en commission française de normalisation de la microbiologie des Aliments V08B de l'AFNOR, la nécessité pour les moyens commerciaux d'identifier ces nouvelles espèces.

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 DGAL avec saisie, ou retrait, ou rappel de produit. Ces « alertes produits » correspondent soit à des non-conformités aux critères réglementaires fixés pour les aliments (présence de *L. monocytogenes* ou dépassement du seuil de 100 *L. monocytogenes*/g-ml), soit parfois à des situations considérées par la DGAL comme une menace pour la santé publique.
4. **plans de surveillance/contrôle et contrôles officiels** placés sous la responsabilité de la DGAL et de la DGCCRF/DGDDI. 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. Annexe A 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*, *L. marthii*, *L. weihenstephanensis*, *L. fleischmannii*) 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.

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 57.000 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 110.000 souches à la fin de l'année 2012. 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* et d'échanges de souches avec un replicat de la collection SLCC à l'Université de Cork en Irlande. 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. En 2012, cette collection a été caractérisée par les méthodes développées par le

CNRL de MLVA et de MVLST.

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 850 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 2012, le CNRL a envoyé 9 souches.

→ En 2012, le CNRL a envoyé 8 souches dans le cadre des plans de surveillance et de contrôle et environ 727 souches d'alertes produits au LNRI (Laboratoire National de référence des *Listeria monocytogenes*) ainsi que leurs profils PFGE dans le cadre de la convention LNR/CNRL d'échange de souches.

⇒ → En 2012, le CNR a réceptionné 180 souches dans le cadre de travaux de recherche.

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 MAINTIEN ET CURATION DE BASES DE DONNEES

Suite à la publication de sa méthode MLST (Ragon et al., 2008 ; Chenal-Francisque et al., 2012), le CNRL avec la plateforme de santé PF8 ont rassemblé l'ensemble des données afin 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. Deux personnels du CNRL assurent la curation et le maintien de cette base.

2.1.4 TECHNIQUES RECOMMANDÉES PAR LE CNRL

2.1.4.1 RECOMMANDATIONS GÉNÉRALES

2.1.4.1.1 EN MICROBIOLOGIE CLINIQUE

Concernant les prélèvements cliniques pour la recherche de *L. monocytogenes*, le CNRL recommande de suivre les recommandations de l'European Manual of Clinical Microbiology / REMIC européen (Anonyme, 2012, pages 291-296).

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 pour les demandes de PCR sur LCR et aux laboratoires spécialisés (Pasteur Cerba ou Biomnis) pour les demandes de sérologie.

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) qui ont un dossier complet de validation, à défaut API *CORYNE* (bioMérieux). Les galeries API *CORYNE* 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*.

D'après son étude publiée en 2011, le CNRL signale pour les identifications par MALDI-TOFF que l'identification au genre est correcte mais que cette méthode ne permet pas une bonne identification à l'espèce.

- *Sérotypage*

Le CNRL ne recommande pas aux laboratoires de 1^{er} intention 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 selon les lots. En outre, ce kit ne contient que 9 sérums des antifacteurs O sur les 15 à utiliser pour sérotyper les *Listeria*. 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, triméthoprime-sulfaméthoxazole. À noter les problèmes d'interprétation de la sensibilité aux sulfamides et dérivés sur gélose MH supplémentée au sang.

Le CNRL recommande l'utilisation du protocole EUCAST dont les protocoles et interprétations sont disponibles à l'adresse web : http://www.eucast.org/antimicrobial_susceptibility_testing/ qui est complété par les valeurs d'interprétation contenus dans le M45A2 du CLSI. Les concentrations minimales inhibitrices et les diamètres sont en cours d'établissement.

A la demande de nombreux laboratoires correspondants, nous proposons le Tableau 23 suivant d'interprétation des résultats d'antibiogrammes.

Tableau 23. Valeurs de référence pour l'interprétation des antibiogrammes pour *Listeria monocytogenes* (* selon le CLSI M45A2 et ** selon l'EU-CAST version 3.1 page 68 à http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/Breakpoint_table_v_3.1.pdf)

Antibiotiques	Critères MIC µg/ml		
	Seuil de sensibilité	Valeurs intermédiaires	Seuil de résistance
Ampicilline**	≤ 1	-	> 1
Amoxicilline*	≤ 4	> 4 - ≤ 16	≥ 16
Gentamicine*	≤ 4	8	≥ 16
Ciprofloxacin*	≤ 1	2	≥ 4
Chloramphenicol*	≤ 8	16	≥ 32
Streptomycine*	≤ 8	> 8 - ≤ 16	> 16
Vancomycine*	≤ 4	8-16	≥ 32
Erythromycine**	≤ 1	-	> 1
Tétracycline*	≤ 4	8	≥ 16
Triméthoprime +Sulfaméthoxazole**	≤ 0.06	-	> 0.06

- *Sérodiagnostic*

Le CNRL ne peut effectuer de recommandations faute d'études prospectives sur de larges cohortes décrivant les performances des tests actuellement disponibles. Il existe des prestataires de ce service en France sur différents kits qui peuvent aboutir à des résultats divergents en absence d'assurance interlaboratoire de la qualité des résultats d'essais. Les résultats de ce sérodiagnostic ne sont pas pris en compte dans la surveillance nationale (Anonyme 2012, 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 pour la réaction de Gruber-Widal). 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)

- La méthode de PCR temps réel sur le gène *hly* développée par le CNRL et le service de microbiologie de l'Hôpital Necker-Enfants Malades pour *L. monocytogenes*.

2.1.4.1.2 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](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.09.07_LISTERIA_MONO.pdf)

En 2012, l'OIE a sollicité le CNRL pour réviser ce chapitre du manuel terrestre.

2.1.4.1.3 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 24 et 25) disponibles sur les sites respectifs : <http://www.afnor-validation.org/afnor-validation-agroalimentaire/agroalimentaire.html> et <http://www.microval.org/validated-methods-Lm.html>.

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'ANSES-LSA (Maisons-Alfort).

Tableau 24. Liste des méthodes alternatives validées AFNOR certification en mars 2013 pour la détection et l'énumération de *Listeria* spp. en microbiologie des aliments et de l'environnement (*Lm* : *Listeria monocytogenes*).

NOM COMMERCIAL	TYPE DE METHODE	PRODUCTEUR
OA One Day	Milieux de culture Détection des <i>Lm</i> et <i>Listeria</i> spp	AES Chemunex
ALOA Count™	Milieux de culture Dénombrement des <i>Lm</i> et <i>Listeria</i> spp	AES Chemunex
Transia Plate <i>Listeria</i>	Tests immuno-enzymatiques Détection des <i>Listeria</i> spp	BioControl Systems
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>Lm</i> et <i>Listeria</i> spp	BIOMERIEUX
Gélose chromID™ Ottaviani Agosti (détection)	Milieux de culture Détection des <i>Lm</i> et <i>Listeria</i> spp	BIOMERIEUX
VIDAS Up <i>Listeria</i>	Tests immuno-enzymatiques Détection des <i>Listeria</i> spp	BIOMERIEUX
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>Lm</i> et <i>Listeria</i> spp	BIO-RAD
iQ Check <i>Listeria</i> spp	PCR - Détection des <i>Listeria</i> spp	BIO-RAD
AL Recherche	Milieux de culture Détection des <i>Listeria</i> spp	BIO-RAD
MicroSEQ <i>Listeria</i> spp	PCR Détection des <i>Listeria</i> spp	Life Technologies Corporation
Oxoid <i>Listeria</i> rapid test	Tests immunologiques Détection des <i>Listeria</i> spp	OXOID Thermofisher Scientific
BAX® Genus <i>Listeria</i> 24E	PCR - Détection des <i>Listeria</i> spp	DuPont Qualicon
GeneDisc <i>Listeria</i> spp	PCR - Détection des <i>Listeria</i> spp	Pall GeneDisc Technologies
RayAl <i>Listeria</i>	Tests immuno-enzymatiques Détection des <i>Listeria</i> spp	RAYAL
Compass <i>Listeria</i> Agar recherche	Milieux de culture Détection des <i>Lm</i> et <i>Listeria</i> spp	SOLABIA S.A.S.

Tableau 25. Liste des méthodes alternatives validées AFNOR certification en mars 2013 pour la détection et l'énumération de *Listeria monocytogenes* en microbiologie des aliments et de l'environnement (*Lm* : *Listeria monocytogenes*).

NOM COMMERCIAL	TYPE DE METHODE	PRODUCTEUR
ALOA One Day	Milieux de culture Détection des <i>Lm</i> et <i>Listeria spp</i>	AES Chemunex
ALOA Count™	Milieux de culture Dénombrement des <i>Lm</i> et des <i>Listeria spp</i>	AES Chemunex
ADIAFOOD <i>Listeria monocytogenes</i>	PCR Détection des <i>Lm</i>	AES Chemunex
Transia Plate <i>Listeria monocytogenes</i>	Tests immuno-enzymatiques Détection des <i>Lm</i>	BioControl Systems
Gélose chromID™ <i>Lmono</i>	Milieux de culture Détection des <i>Lm</i>	BIOMERIEUX
Gélose chromID™ Ottaviani Agosti (dénombrement)	Milieux de culture Dénombrement des <i>Lm</i>	BIOMERIEUX
Gélose chromID™ Ottaviani Agosti (détection)	Milieux de culture Détection des <i>Lm</i>	BIOMERIEUX
Vidas <i>Listeria monocytogenes</i> 2 (avec étape d'enrichissement à 30°C)	Tests immuno-enzymatiques Détection des <i>Lm</i>	BIOMERIEUX
Vidas <i>Listeria monocytogenes</i> 2 (avec étape d'enrichissement à 37°C)	Tests immuno-enzymatiques Détection des <i>Lm</i>	BIOMERIEUX
Vidas <i>Listeria</i> DUO	Tests immuno-enzymatiques Détection des <i>Lm</i> et <i>Listeria spp</i>	BIOMERIEUX
VIDAS <i>Listeria monocytogenes</i> Xpress (VIDAS LMX)	Tests immuno-enzymatiques Détection des <i>Lm</i>	BIOMERIEUX
Rapid L'Mono (Recherche)	Milieux de culture Détection des <i>Lm</i> et <i>Listeria spp</i>	BIO-RAD
Rapid L'Mono (Dénombrement)	Milieux de culture Détection des <i>Lm</i>	BIO-RAD

Tableau 25 (suite)

NOM COMMERCIAL	TYPE DE METHODE	PRODUCTEUR
IQ Check <i>Listeria monocytogenes</i>	PCR Détection des <i>Lm</i>	BIO-RAD
AL Recherche	Milieux de culture Détection des <i>Lm</i>	BIO-RAD
AL Dénombrement	Milieux de culture Détection des <i>Lm</i>	BIO-RAD
CHROMagar™ <i>Listeria</i>	Milieux de culture Détection des <i>Lm</i>	CHROMagar
CHROMagar™ <i>Listeria</i> numeration	Milieux de culture Dénombrement des <i>Lm</i>	CHROMagar
Lumiprobe 24 <i>Listeria monocytogenes</i>	Tests d'hybridation moléculaire Détection des <i>Lm</i>	EUROPROBE SA
Accuprobe <i>Listeria monocytogenes</i>	Tests d'hybridation moléculaire Détection des <i>Lm</i>	GEN-PROBE Inc
MicroSEQ <i>Listeria monocytogenes</i>	PCR Détection des <i>Lm</i>	Life Technologies Corporation
<i>Listeria</i> Precis™	Milieux de culture Détection des <i>Lm</i>	OXOID Thermofisher Scientific
<i>Listeria</i> Precis™	Milieux de culture Dénombrement des <i>Lm</i>	OXOID Thermofisher Scientific
BAX [®] <i>Listeria</i> mono 24E	PCR Détection des <i>Lm</i>	DuPont Qualicon
GeneDisc <i>Listeria monocytogenes</i>	PCR Détection des <i>Lm</i>	Pall GeneDisc Technologies
Compass <i>Listeria</i> Agar recherche	Milieux de culture Détection des <i>Lm</i>	SOLABIA S.A.S.
Compass <i>Listeria</i> Agar dénombrement	Milieux de culture Dénombrement des <i>Lm</i>	SOLABIA S.A.S.

2.1.5 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.

2.1.6 TECHNIQUES TRANSFERÉES VERS D'AUTRES LABORATOIRES

Le CNRL a transféré son protocole de typage PFGE *Sma*I à son homologue CNR belge, Dr Sophie Bertrand, dans le cadre de l'investigation sur l'épidémie française (Dépassement de seuil L12/13).

2.1.7 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.

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.

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. Les principaux axes de développement à effectuer sont : développement d'un module d'envoi d'un accusé de réception des envois aux laboratoires expéditeurs, la mise en conformité des rapports d'essais à la norme NF EN ISO 15189, le développement de l'informatisation de la surveillance ainsi que de transferts de données et la compatibilité de LAGON[®] avec le système de surveillance européen TESSY.

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 13.000 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 axe de développement, la création de librairie de profils est nécessaire à terme pour simplifier la surveillance ainsi que l'analyse de tendance d'apparition/disparition de profils et de fréquences des profils pour informer les membres de la cellule de la rareté ou non du profil étudié.

Management de la qualité : Kalilab® et WebCampus

En 2012, un logiciel de management de la qualité a Kalilab® été acquis par le CNRL afin de gérer les anomalies et les réclamations clients. Le logiciel Webcampus de gestion documentaire a été également installé pour dématérialiser le système documentaire du management de la qualité du CNRL.

ANNEXE C:

COMMUNICATION NATIONALE – RESUME NON PUBLIE

Assessing the genetic diversity of *Listeria monocytogenes* through Multiple Locus Variable of Tandem Repeat Analysis (MLVA) - Evaluation of MLVA as a molecular subtyping method for *Listeria monocytogenes*, Journée du Département Infection & Epidémiologie, Institut Pasteur, Paris, 27-28 Septembre 2012.

V. Chenal-Francisque¹, L. Diancourt², T. Cantinelli¹, V. Passet², H. Bracq-Dieye¹, A. Leclercq¹, C. Pourcel³, S. Brisse^{2*} and M. Lecuit^{1*}

1 Institut Pasteur, National Reference Center for *Listeria* and World Health Organisation Collaborating Center for *Listeria*, Microbes and host barriers Group, Paris, France

2 Institut Pasteur, Genotyping of Pathogens and Public Health, Paris, France

3 Paris-Sud University, Institut of Genetics and Microbiology, Orsay, France

*contributed equally

Listeria monocytogenes (*Lm*) is a major foodborne pathogen that causes listeriosis, a serious invasive disease. Because of its high mortality rate and the fact that it occurs in pregnant women, listeriosis is widely recognized as a significant public health issue. *Lm* control is a major issue for the food processing industry, and this has led several countries (Europe, USA and Canada) to develop surveillance systems to track *Lm* contamination and monitor listeriosis cases. Molecular subtyping approaches have been proven to be particularly useful for epidemiological purposes as well as to understand the evolution of *Lm*. Diverse molecular subtyping methods have been developed for the early detection of human outbreaks, to trace the source of the original contamination and track *Lm* contamination of food processing environments, as well as for *Lm* population genetics purposes. PFGE (the gold standard subtyping method for *Listeria* surveillance) and MLST (a reference method for global epidemiology) both present limitations. Besides, MLVA, which takes advantage of the variation of the number of tandem repeats at specific loci in the bacterial genome, has been recently proposed by several authors as a promising tool to characterize *Lm* isolates.

To evaluate MLVA as an *Lm* subtyping method, we undertook an exhaustive study on a very wide collection of available *Lm* isolates and genomes, assessed all already described VNTRs. From this analysis, we have identified new VNTRs, developed an optimized MLVA assay and compared it to PFGE and to MLST. MLVA appears less discriminatory than PFGE and is thus not suitable to replace PFGE in daily surveillance. However, MLVA and MLST lead to fully concordant data, indicating that MLVA, which is cheaper and faster than MLST, is a valuable tool to subtype *Lm* particularly in the context of clustered cases and outbreak investigations.

ANNEXE D: DISTRIBUTION DES DIAMETRES DES ZONES D'INHIBITION POUR DIFFERENTS ANTIBIOTIQUES

Figure 27. Distribution des diamètres des zones d'inhibition pour l'ampicilline (le trait rouge signale la valeur de référence EUCAST pour la résistance).

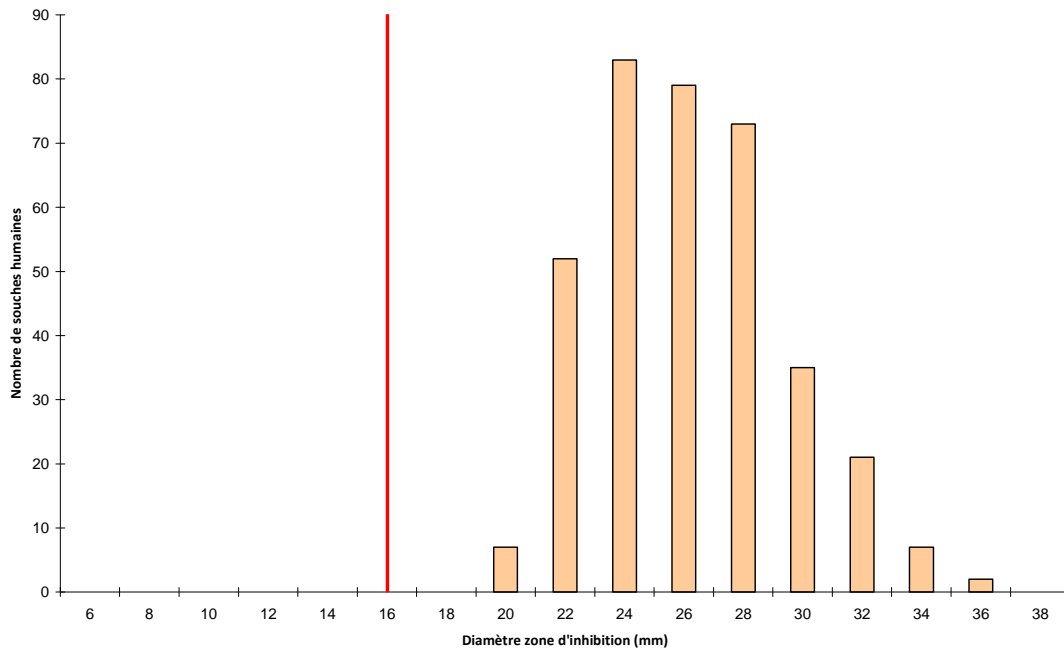


Figure 28. Distribution des diamètres des zones d'inhibition pour l'amoxicilline (le trait rouge signale la valeur de référence CLSI pour la résistance).

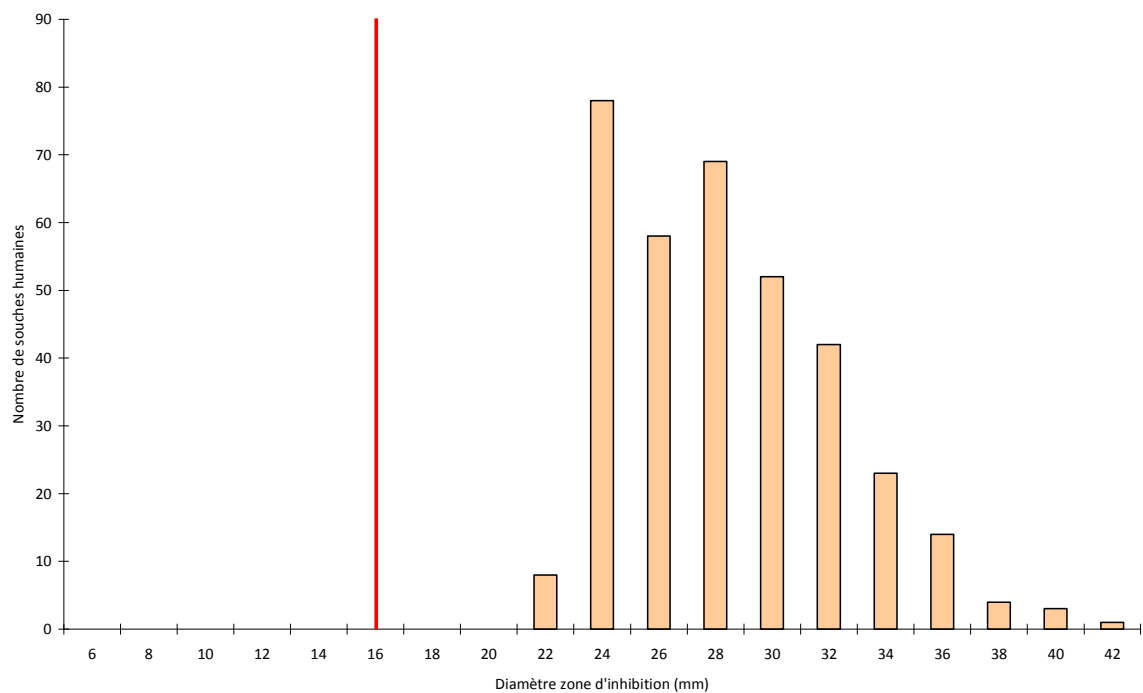


Figure 29. Distribution des diamètres des zones d'inhibition pour la gentamicine (Pas de valeur spécifique de référence).

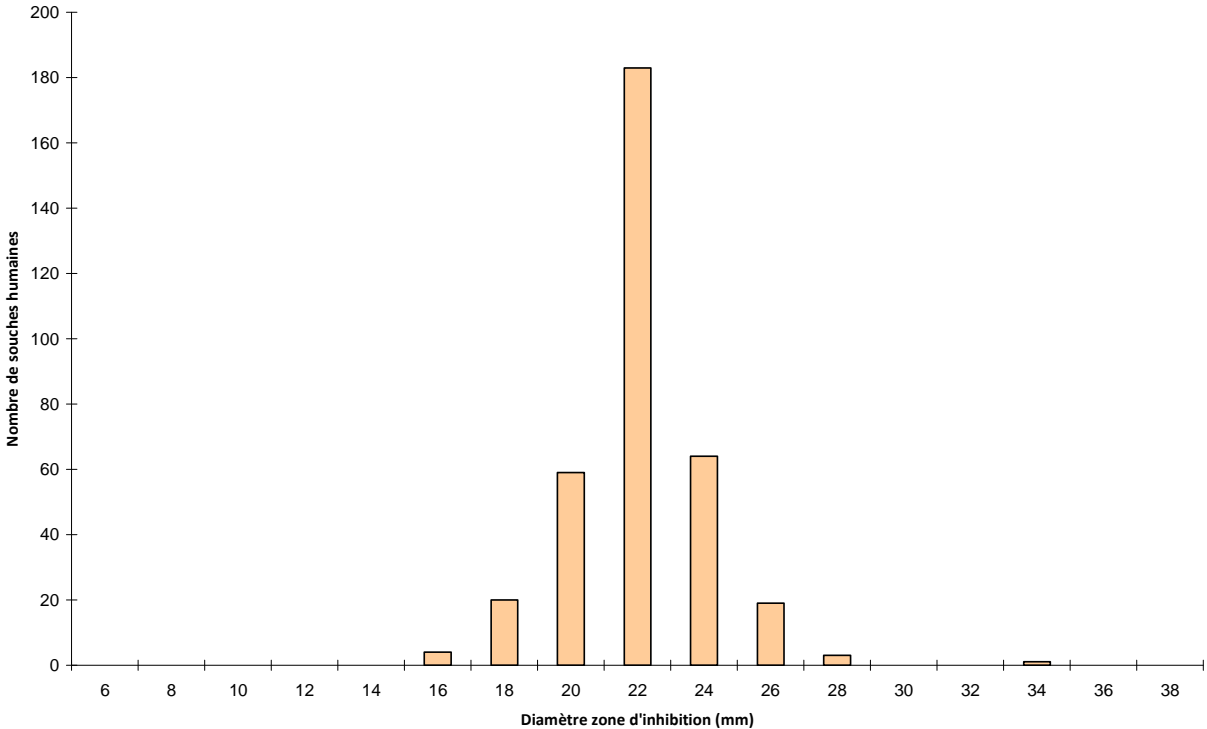


Figure 30. Distribution des diamètres des zones d'inhibition pour le triméthoprime (Pas de valeur spécifique de référence avec la concentration des disques utilisés au CNR).

