



DATE : Avril 2014

RESPONSABLE :	Marc LECUIT
RESPONSABLE ADJOINT :	Alexandre LECLERCQ
INGENIEUR :	Viviane CHENAL-FRANCISQUE
MEDECIN CHERCHEUR :	Caroline CHARLIER-WOERTHER
TECHNICIENS :	Hélène BRACQ-DIEYE Anne MORVAN Thomas CANTINELLI / Morgane LAVINA
SECRETAIRE :	Martine 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. 2014. Rapport annuel d'activité du Centre national de Référence des Listeria – Année 2013. 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 2013 de souches et de renseignements permettant de remplir sa mission de surveillance microbiologique de la listériose en France et d'établir ce rapport.

Le trait dans la marge gauche dans les annexes indique le texte révisé en 2014.

RESUME DE L'ANNEE 2013

En 2013, le nombre total de souches humaines et non humaines réceptionnées au Centre National de Référence *Listeria* (CNRL), hors programmes de recherche, a augmenté de 11% (1704 isolats), avec un accroissement de 7% du nombre de souches humaines (368). Cette augmentation, qui concerne principalement les formes neuroméningées, avait déjà été constatée au second semestre de l'année 2012. Le CNRL a caractérisé et typé l'ensemble de ces souches dans le cadre de sa mission de surveillance microbiologique de la listériose. Ces activités sont en cours de mise en conformité pour la norme d'accréditation EN ISO 15189.

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 2013, une toxi-infection alimentaire collective et deux épidémies ont été investiguées avec les autorités compétentes, conduisant à l'identification de l'aliment contaminé. Le CNR continue son information des professionnels de santé sur les formes rares de listérioses en publiant des études rétrospectives des cas français (études en cours des infections biliaires et vasculaires).

En 2013, le CNRL a échangé des informations avec les structures de surveillance européennes de la listériose par le biais de la plateforme EPIS (Epidemic Intelligence Information System) de l'ECDC lors des alertes sanitaires européennes, et avec la nouvelle surveillance microbiologique moléculaire européenne par le biais des programmes TESSY (The European Surveillance System) et ELITE (European *Listeria* Typing Exercise). Le CNRL / CC-OMS *Listeria* a effectué une enquête préliminaire pour identifier les besoins du réseau international des Centres Nationaux de Référence des *Listeria* et a obtenu des réponses de 41 pays. Le CNRL a participé au symposium international sur *Listeria* et la listériose (ISOPOL, Goa, Inde ; 4 communications et 5 posters).

Le CNRL 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 publié une méthode MvLST (Multi-virulence-Locus Sequence Typing) démontrant que les clones qualifiés d'« épidémiques » sont en fait anciens et ubiquitaires, et a mis au point une méthode de déduction des Séquences Types (ST) de MLST à partir des profils PFGE, afin de mieux caractériser la structure génétique des souches de *L. monocytogenes*.

La caractérisation moléculaire des souches de *L. monocytogenes* 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 cette espèce bactérienne. Le CNRL a poursuivi l'analyse des complexes clonaux et des génomes d'un échantillon de souches cliniques, alimentaires et environnementales représentatives, afin d'étudier la biodiversité et l'évolution de *L. monocytogenes*, de caractériser l'émergence de clones d'intérêt épidémiologique, médical et microbiologique, de mieux comprendre les bases moléculaires de la virulence de cette espèce bactérienne, d'évaluer l'intérêt de son utilisation pour la surveillance et de développer de nouveaux outils de diagnostics et de typage moléculaire.

Afin de mieux caractériser les formes cliniques de la listériose, d'en 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. Le recrutement s'est achevé en juillet 2013, permettant l'inclusion de 427 cas de septicémie, 252 cas d'infection du système nerveux central et 107 cas d'infection materno-fœtale. Financée principalement par le programme hospitalier de recherche clinique national (PHRC), elle va permettre de mieux caractériser et comprendre cette infection sévère. L'analyse des données recueillies est en cours. Cette étude cas-témoins permettra également d'évaluer l'apport éventuel de nouvelles techniques diagnostiques.

En lien avec l'Unité de Biologie des Infections, auquel il est affilié, le CNRL participe également à l'étude de la physiopathologie de la listériose. Le CNRL participe à des 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 comprendre la physiopathologie de la listériose et (iii) à valider de nouvelles approches thérapeutiques.

TABLE DES MATIERES

1. INTRODUCTION : LA LISTERIOSE.....	7
2. ACTIVITES DE SURVEILLANCE	9
2.1. SURVEILLANCE DE LA LISTERIOSE HUMAINE EN FRANCE	9
2.2. INTERACTIONS DU CNR AVEC LES DIFFERENTS ACTEURS NATIONAUX ET INTERNATIONAUX	14
2.3. DONNEES DE LA SURVEILLANCE MICROBIOLOGIQUE DE LA LISTERIOSE HUMAINE.....	15
2.4. CARACTERISATION DES SOUCHES D'ORIGINE NON HUMAINE REÇUES AU CNRL	36
2.5. BILAN DES INVESTIGATIONS, DEPASSEMENTS DE SEUIL ET ALERTES	42
3. ACTIVITES D'INFORMATION, DE FORMATION ET DE CONSEIL.....	47
3.1. CENTRE DE DOCUMENTATION	47
3.2. SITE INTERNET.....	47
3.3. VEILLE INTERNET	47
3.4. ENSEIGNEMENTS, FORMATIONS, ACCUEIL DE STAGIAIRES.....	47
3.5. PARTICIPATION A LA REDACTION DE COMMUNICATION ECRITES DIDACTIQUES.....	48
3.6. ACTIVITE DE CONSEIL.....	48
3.7. EXPERTISES.....	49
3.8. RETOUR D'INFORMATIONS	49
4. TRAVAUX DE RECHERCHE EN LIEN DIRECT AVEC L'ACTIVITE DU CNRL.....	51
4.1. CONTRIBUTIONS AUX ETUDES EPIDEMIOLOGIQUES	51
4.2. ANALYSES CLINIQUES	52
4.3. METHODES DE DIAGNOSTIC ET ATYPIES DES SOUCHES	54
4.4. ETUDES DE LA VIRULENCE.....	56
4.5. TAXONOMIE	56
4.6. DEVELOPPEMENT DE NOUVEAUX OUTILS DE TYPAGE MOLECULAIRE	57
4.7. ETUDE DE LA DIVERSITE DES <i>LISTERIA</i>	58
4.8. ETUDE DE LA RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES	59
4.9. PROJETS COLLABORATIFS.....	59
5. LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS.....	60
5.1. PUBLICATIONS NATIONALES	60
5.2. PUBLICATIONS INTERNATIONALES	60
5.3. CHAPITRES DE LIVRES	61
5.4. COMMUNICATIONS NATIONALES.....	61
5.5. COMMUNICATIONS INTERNATIONALES.....	61
5.6. CONFÉRENCES SUR INVITATIONS	62
5.7. PRESENCE DANS LES MEDIAS	63
6. PROGRAMME D'ACTIVITE POUR LES ANNEES 2014-2015.....	64
7. REFERENCES.....	65
ANNEXE A. HISTORIQUE ET MISSIONS DU CNRL.....	68
A.1. HISTORIQUE	68
A.2. LES MISSIONS SPECIFIQUES DU CNRL.....	68
ANNEXE B : ORGANISATION DU CNR	70
B.1. PERSONNEL PERMANENT	70
B.2. LOCAUX	72
B.3. EQUIPEMENT	73
B.4. MISE EN PLACE DE LA DEMARCHE DE MANAGEMENT DE LA QUALITE ET HYGIENE/SECURITE AU SEIN DU CNRL.....	74
ANNEXE C : ACTIVITES D'EXPERTISE DU CNR <i>LISTERIA</i>	76

C.1. IDENTIFICATION ET CARACTERISATION DES SOUCHES DE <i>L. MONOCYTOGENES</i> : METHODES ET MARQUEURS EPIDEMIOLOGIQUES DISPONIBLES	76
C.2. TECHNIQUES DEVELOPPEES OU A L'ETUDE EN 2013.....	77
C.3. MAINTIEN, DETENTION ET DIFFUSION DE MATERIEL BIOLOGIQUE.....	78
C.4. DIFFUSION ET ECHANGE DE MATERIEL BIOLOGIQUE.....	80
C.5. TECHNIQUES RECOMMANDEES PAR LE CNRL.....	81

LISTE DES ABREVIATIONS ET ACRONYMES

Abréviation / Acronymes	Dénomination
ADN	Acide désoxyribonucléique
ANSES-LSA	Laboratoire de Santé animale de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
ARS	Agence Régionale de Santé
CCOMS	Centre Collaborateur de l'OMS des <i>Listeria</i>
CDC	Center for Diseases Control
CFU	Colonie Formant Unité
CNRL	Centre National de Référence des <i>Listeria</i>
COM	Collectivité d'Outre Mer
DG/DCCRF	Direction Générale / Départementale de la Consommation et de la Répression des Fraudes
DGAI	Direction Générale de l'Alimentation
DGS	Direction Générale de la Santé
DG SANCO	Direction Générale de la Santé et du Consommateur
DO	Déclaration Obligatoire
DROM-TOM	Département & Région et Territoire d'Outre Mer
EFSA	European Food Safety Agency
ELITE	Epidemic Intelligence Information System
EQA	Essai d'intercomparaison - Essai externe de la qualité
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FWD	Food and Water-borne Diseases
GEA	Gastro-entérite aiguë
IIa	Sérovars 1/2a et 3a de <i>Lm</i>
IIb	Sérovars 1/2b, 3b et 7 de <i>Lm</i>
IIc	Sérovars 1/2c et 3c de <i>Lm</i>
IVb	Sérovars 4b, 4d et 4e de <i>Lm</i>
L	Sérovars 4a, 4ab et 4c de <i>Lm</i>
InVS	Institut de Veille Sanitaire
INSEE	Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques
ISOPOL	International Symposium On Problems Of Listeriosis
<i>Lm</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
LNRI	Laboratoire National de Référence des <i>Listeria monocytogenes</i>
MN	Materno-néonatal(e)
N	Système nerveux central
PCR	Réaction de polymérisation en chaine
PFGE	Electrophorèse en champs pulsé
S	Septicémie
TESSY	European Surveillance System

1. INTRODUCTION : LA LISTERIOSE

La listériose est une maladie infectieuse humaine d'origine alimentaire et une zoonose, dont l'agent étiologique est *Listeria monocytogenes* (Lm), une bactérie ubiquitaire, et dont les caractéristiques principales sont :

- l'existence d'une **population à risque** : les femmes enceintes et leurs nouveau-nés, les personnes âgées (> 70 ans) et les sujets dont l'immunité innée et/ou cellulaire est diminuée (immunosuppresseurs, corticothérapie, chimiothérapie, cancer, diabète, alcoolisme, ...);
- une **présentation clinique sous différentes formes**: la listériose peut se traduire par une gastro-entérite fébrile (GEA) isolée, une infection invasive, ou très rarement une infection focale. Les GEA résultent principalement de la contamination alimentaire massive de sujets immuno-compétents (5, 13, 43). Les formes invasives comportent les formes septicémiques (S) et les infections du système nerveux central (N), qui surviennent en règle chez des sujets immunodéprimés, et les formes materno-néonatales (MN). Ces trois présentations représentent plus de 90% des formes invasives. D'autres manifestations, rares, sont parfois observées, telles que les formes cutanées isolées (19), les infections ostéo-articulaires (7), biliaires ou vasculaires ;
- une **transmission par voie alimentaire** (>99 % des cas). La femme enceinte peut transmettre l'infection au fœtus *in utero* par voie trans-placentaire, ou, très exceptionnellement, durant l'accouchement. La transmission directe par voie cutanée, exceptionnelle, a été observée chez les vétérinaires et fermiers après mise bas d'un animal porteur ou lors d'avortements liés à une listériose animale.
- une **morbi-mortalité très élevée** : les formes invasives non MN sont associées à une mortalité de 20 à 30% et les formes neuroméningées représentent la quatrième cause de méningo-encéphalite en France. Elles requièrent quasi systématiquement une hospitalisation (93%), souvent prolongée et en soins intensifs. Les infections MN se compliquent de perte fœtale dans 25% des cas, mais sont en règle sans gravité pour la mère.
- le **coût de l'infection** par patient est élevé (32).
- l'**incidence** de la listériose en France a diminué notablement de 1987 à 2001, puis s'est stabilisée de 2001 à 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. Elle était au voisinage de 5 cas/million d'habitants de 2007 à 2012 (21, 23). Elle est évaluée en 2013 à 5,7 cas/million d'habitants. Cette incidence est du même ordre de grandeur que celle observée dans les pays bénéficiant d'un système de surveillance de l'infection.
- la listériose humaine se présente essentiellement sous forme de **cas sporadiques**, plus rarement par des cas groupés, voire de véritables **épidémies**. Plus de 79 épidémies ont été rapportées dans la littérature à ce jour dont 12 en France (Tableau 1). Celles-ci ont diminué en magnitude et en fréquence avec la mise en place des différents éléments du système de surveillance en France.

Tableau 1. Tableau récapitulatif des épidémies françaises de 1992 à 2013

Année	Nombre de cas	Aliments	Durée de l'épidémie
1992	279	Langue de porc en gelée	10 mois
1993	38	Rillettes	3,5 mois
1995	36	Brie	4,5 mois
1997	14	Pont-l'Évêque	4,5 mois
1999	4	Époisses	2 mois
2000	10	Rillettes	4 mois
2000	32	Langue de porc en gelée	3,5 mois
2002	11	Saucisse à tartiner (tartinette)	3 mois
2003	4	Mortadelle	2 mois
2012	11	Brie	3 mois
2013	3	Fromage de Brebis	2 mois
2013	11	Quenelle	Non clôturée

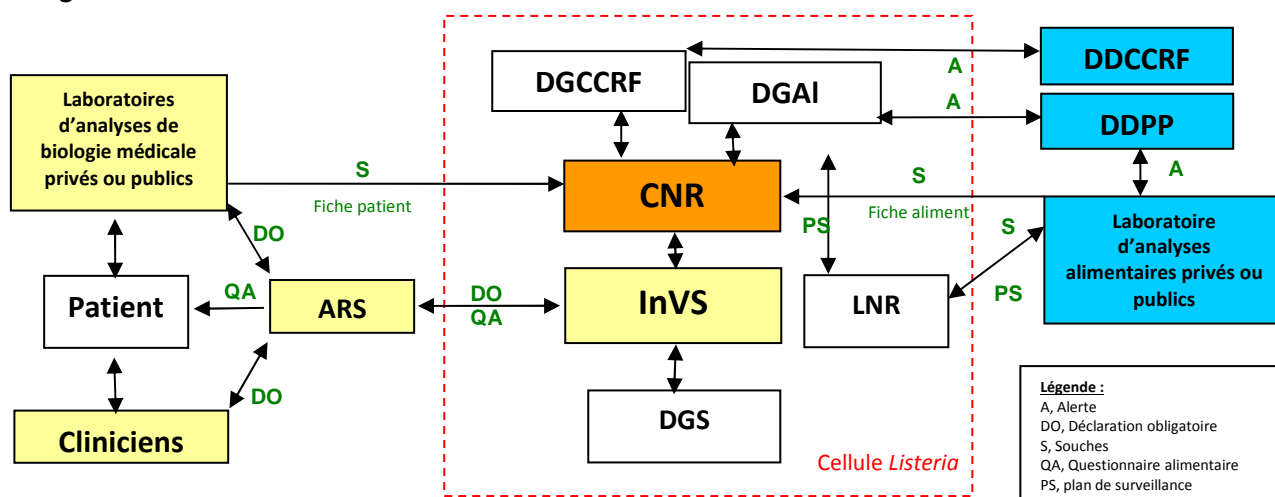
- la listériose n'est que **rarement rapportée dans les pays du Sud**. Sa réelle incidence y reste inconnue. Plusieurs facteurs se conjuguent pour rendre compte de ces différences entre Nord et Sud. Le manque de moyens diagnostiques et l'absence de système de surveillance, ainsi que la prévalence élevée de nombreuses autres pathologies infectieuses plus fréquentes et graves, rendent son diagnostic difficile. La population à risque de listériose y est relativement plus restreinte (âge moyen plus faible et utilisation de traitement immunosuppresseurs limitée). Enfin, il existe des différences de production et de consommation des aliments (moindre diffusion d'aliments d'origine industrielle potentiellement contaminés, moindre utilisation et conservation de produits réfrigérés), qui peuvent conduire à une moindre exposition de la population.

2. ACTIVITES DE SURVEILLANCE

2.1. SURVEILLANCE DE LA LISTERIOSE HUMAINE EN FRANCE

Le CNRL est en charge de la surveillance microbiologique de la listériose et participe aux investigations destinées à identifier l'origine alimentaire des cas (Figure 1) (16). Cette surveillance s'effectue en lien avec l'Institut de Veille Sanitaire (InVS), la Direction Générale de la Santé (DGS), la Direction Générale de l'Alimentation (DGAL) et la Direction Générale de la Consommation, de la Concurrence et de la Répression des Fraudes (DGCCRF), qui composent depuis 1992 la cellule *Listeria*, qui compte aussi depuis 2007 le Laboratoire National de Référence des *Listeria monocytogenes* (LNR) situé au laboratoire de Santé animale de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES-LSA). Le fonctionnement de cette entité est formalisé depuis janvier 2004 par la « Procédure relative au fonctionnement de la Cellule *Listeria* chargée de la coordination des investigations et des actions autour de cas groupés de listériose ». Les missions de la cellule sont (i) la détection des cas groupés de listériose, (ii) la proposition et la coordination des investigations et actions à mettre en œuvre devant des cas groupés potentiellement liés à une source commune de contamination, (iii) leur gestion et leur prévention.

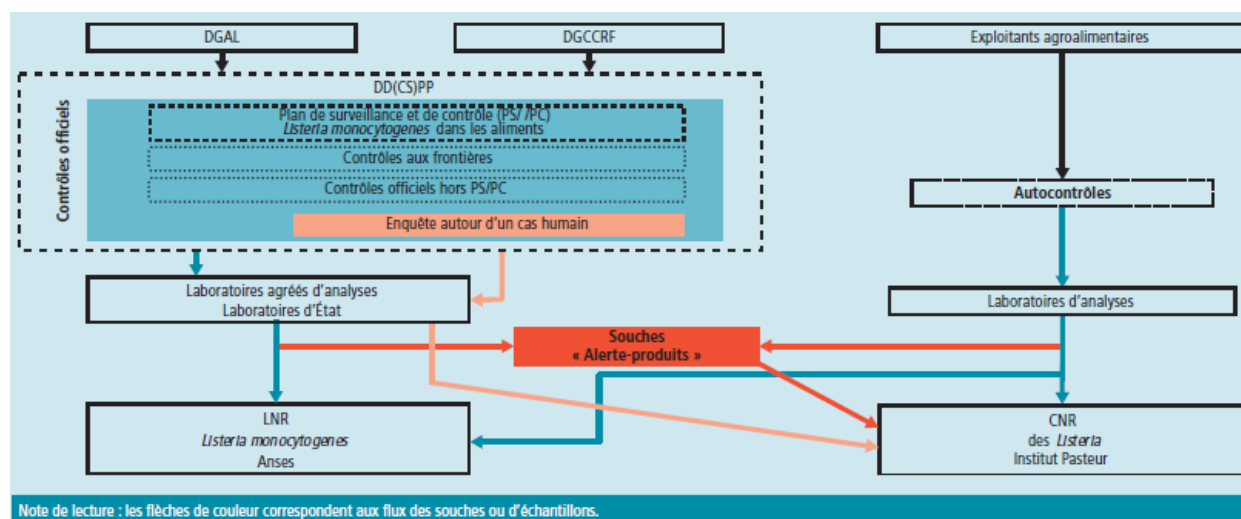
Figure 1. Schéma de fonctionnement de la cellule *Listeria*



CNR : Centre national de Référence des *Listeria* ; LNR : Laboratoire National de référence ; InVS : Institut de Veille Sanitaire ; DGAL : Direction Générale de l'Alimentation ; DDPP : Directions Départementales de la Protection des Populations ; DDCCRF : Direction Départementales de la Consommation et de la Répression des Fraudes ; DGCCRF : Direction Générale de la Consommation et de la Répression des Fraudes ; ARS : Agence Régionale de Santé ; DGS : Direction Générale de la Santé.

Au sein de la « Cellule *Listeria* », le CNRL joue un rôle scientifique, technique et d'aide à la décision. Le circuit des souches d'origine alimentaire ou environnementale a été formalisé par la cellule *Listeria* comme présenté à la Figure 2.

Figure 2. Circuit des souches sur le schéma de surveillance microbiologique français des *Listeria monocytogenes* (Source : BEH. 2012. Surveillance des *L. monocytogenes* dans les aliments. Hors Série : 41-45 (46))



[SURVEILLANCE MICROBIOLOGIQUE DE LA LISTERIOSE EN FRANCE](#)

Le diagnostic de listériose repose sur l'isolement de *Lm* à partir d'un prélèvement biologique physiologiquement stérile ou de prélèvements périnataux.

La surveillance effectuée par le CNRL se fonde sur la caractérisation des souches isolées de patients et adressées volontairement par les biologistes, en parallèle à la déclaration obligatoire envoyée à l'ARS. Les cas diagnostiqués par une autre technique (biologie moléculaire ou sérologie) ne sont à ce jour pas retenus dans le cadre de la DO (1), car ces méthodes n'ont pas été formellement validées. La PCR *hly* est cependant très spécifique et peut constituer une aide diagnostique pour le clinicien, notamment dans les formes neuroméningées. Ce n'est pas le cas des tests sérologiques. Le CNRL caractérise également les souches alimentaires et environnementales qui lui sont adressées dans le cadre du système de surveillance.

L'activité de surveillance du CNRL consiste à :

1. Confirmer l'identification de la souche ;
2. Analyser les caractéristiques microbiologiques (sérotipe, groupe PCR, profils de macrorestriction d'ADN, sensibilité aux antibiotiques) des souches isolées de cas humains, d'aliments ou d'environnement agro-alimentaires;
3. Recueillir les informations cliniques associées aux cas ou aux souches d'aliments ou d'environnement agro-alimentaires au moyen d'une fiche de renseignements.

Ces éléments permettent :

1. d'identifier les souches doublons (patients transférés dans différents hôpitaux, couples mère-enfant comptant pour une seule infection, etc.)
2. de suivre les tendances épidémiologiques (répartition des formes cliniques, caractéristiques des souches, évolution du nombre de cas, etc.) ;
3. de détecter les épidémies, par la détection de cas groupés, en caractérisant les souches isolées et en surveillant l'apparition de cas qui lui sont liés;
4. de participer à l'étude des phénomènes épidémiques en lien avec l'InVS: identification des cas épidémiques, du véhicule alimentaire, caractérisation de la souche épidémique.

SURVEILLANCE ET DEPASSEMENT DE SEUIL

Plusieurs étapes successives d'alerte sont définies :

1. Définition de profil rare, fréquent et endémique :

Un profil de macrorestriction d'ADN (PFGE), ou pulsotype, est défini comme « rare » lorsqu'il est associé à moins de 6 cas de listériose humaine par an. Il est qualifié de « fréquent » lorsqu'entre 6 et 12 cas par an sont associés à ce pulsotype, et « endémique » lorsqu'il y a plus de 12 cas par an associés. Les pulsotypes endémiques sont actuellement au nombre de 3 (M-IVb-210792-210792, M-IVb-200792-200792 et M-IVb-151005-151005).

2. Dépassement de seuil (« cas groupés »)

Un dépassement de seuil est défini par la survenue de 3 cas de listériose sur 6 semaines dus à des souches de même groupe PCR et de pulsotype rare ou fréquent similaires. Deux pulsotypes sont dits similaires s'ils diffèrent d'une bande en position ou en présence pour les enzymes de restriction *Ascl* et/ou *Apal*. Le seuil retenu pour définir un dépassement de seuil en cas de pulsotype endémique est de 6 cas en 6 semaines (Décision Cellule *Listeria*, 2012). Le CNRL effectue chaque semaine un rapport sur chaque dépassement de seuil par courrier électronique aux autres membres de la Cellule *Listeria* regroupant les informations sur les souches humaines impliquées, leur fréquence mensuelle depuis la première détection du profil dans la base de données du CNRL/CCOMS et les souches alimentaires reçues les 6 derniers mois ayant les mêmes caractéristiques microbiologiques.

3. Surveillance renforcée

Tout dépassement de seuil est suivi d'une phase de surveillance renforcée durant laquelle le CNRL signale toute nouvelle souche d'origine humaine ou alimentaire similaire à celle du dépassement de seuil, tandis que l'InVS conduit les questionnaires alimentaires et les enquêtes épidémiologiques appropriées. La Cellule *Listeria* décide au vu des résultats de ces investigations des actions à mettre en œuvre: analyse des informations disponibles (résultats des contrôles, retraits de produits), demande de transmission au CNRL de souches isolées à la production ou à la distribution, identification des marques commercialisant les produits contaminés, prélèvements dans les magasins où s'approvisionnent les patients, enquêtes dans des établissements de production, etc. La phase de surveillance renforcée est close lorsque plus aucun nouveau cas dû à une souche avec des caractéristiques microbiologiques identiques à celle du dépassement de seuil n'est détectée pendant 6 semaines. Le CNRL informe alors la Cellule *Listeria* de la clôture du dépassement de seuil et ne signale plus, sauf avis contraire de la cellule *Listeria*, les cas humains avec une souche identique.

4. la phase d'Alerte

La Cellule *Listeria* peut décider du passage en phase d'alerte, définie comme toute situation présentant une menace potentielle pour la santé publique et nécessitant la mise en œuvre d'investigations ou d'actions complémentaires, soit en raison du nombre de cas détectés, soit en raison des hypothèses sur l'origine de la contamination.

La Cellule *Listeria* propose les investigations complémentaires et les actions à mener. Toutes les souches de *Lm* isolées dans le cadre de ces investigations sont envoyées au CNRL. La phase d'Alerte est levée par la Cellule *Listeria*. Certaines mesures spécifiques de surveillance peuvent être maintenues après la levée de l'Alerte.

5. Cas sporadiques, groupés et épidémies

Une épidémie correspond à un excès de cas de listériose, liés à une souche définie, le plus souvent en rapport avec une exposition précise, identifiée ou non. La déclaration d'épidémie est décidée par la Cellule *Listeria*, et tient compte de la distribution des cas dans le temps et sur le territoire. De façon schématique, si les cas possiblement liés à une même source sont regroupés dans le temps et l'espace,

il est considéré qu'il s'agit de cas groupés (cf définition ci-dessus), alors que s'il existe une distribution relativement large dans le temps et l'espace, une épidémie pourra alors être déclarée. Un cas isolé, survenant en dehors de cas groupés ou d'épidémie, est qualifié de sporadique. La très grande majorité des cas de listériose identifiés par la déclaration obligatoire en France sont sporadiques.

6. Toxi-infection alimentaire collective

Il s'agit de la survenue d'au moins deux cas similaires d'une symptomatologie, en général gastro-intestinale, dont on peut rapporter la cause à une même origine alimentaire.

SURVEILLANCE ALIMENTAIRE

Les alertes-produits

Une alerte-produit est lancée quand une denrée alimentaire non-conforme aux critères microbiologiques de sécurité du règlement européen 2073/2005 modifié (100 UFC/g ou absence/présence) (3, 4), et présentant donc un risque pour la santé publique, a été mise sur le marché et que des mesures de retrait et/ou rappel auprès du consommateur doivent être prises. Les alertes-produits peuvent être issues de contextes de surveillance variés comme les contrôles officiels, les autocontrôles effectués par les professionnels ou les plans de surveillance et de contrôle. En France, ces alertes-produits sont déclenchées en cas de présence de *Lm* au sein de tout produit mis sur le marché, à consommer en l'état et permettant la croissance de *Listeria*, quel que soit le résultat du dénombrement, limite plus stricte que celle prévue par le règlement européen 2073/2005 modifié (100 UFC/g) (3, 4). Le CNRL effectue chaque semaine un rapport transmis par courrier électronique aux membres de la Cellule *Listeria*, concernant les souches d'alertes-produits. Il regroupe les informations sur ces souches, indique la fréquence des pulsotypes correspondants parmi les souches humaines depuis son premier archivage dans la base de données du CNR/CCOMS, et liste les souches humaines des 3 derniers mois avec les mêmes caractéristiques microbiologiques.

Les enquêtes autour d'un cas de forme neuroméningée

Depuis 2001, pour tous les cas d'infection neuroméningée (cas avec signes cliniques d'atteinte neuroméningée et souche de *Lm* isolée du sang ou du LCR), des prélèvements des aliments dans le réfrigérateur du patient ou de son environnement (avec l'accord du patient ou le cas échéant de sa famille) sont réalisés par la DDPP. Des prélèvements dans les lieux d'achats du patient par la DDPP ou la DDCCRF peuvent également être effectués. Le CNRL compare les pulsotypes des souches isolées des aliments à celle(s) isolée(s) chez le patient afin de tenter d'identifier l'aliment à l'origine du cas.

SURVEILLANCE DE LA RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES

La surveillance de la résistance de *Lm* aux antibiotiques est effectuée pour 23 antibiotiques (céfotaxime, sulfonamides, kanamycine, clindamycine, rifampicine, tétracycline, erythromycine, chloramphénicol, ciprofloxacine, moxifloxacine, levofloxacine, linézolide, triméthoprim, gentamicine, acide fusidique, vancomycine, streptomycine, pénicilline g, ampicilline, amoxicilline, acide nalidixique, imipénème, fosfomycine), à la recherche de résistances naturelles ou acquises, selon la méthodologie de diffusion détaillée dans l'annexe C. Les résultats de la surveillance des souches d'origine humaine isolées en 2013 sont présentés dans le chapitre 2.3.

DETECTION ET ANALYSE DES INFECTIONS NOSOCOMIALES

Le caractère nosocomial des infections à *Lm* est difficile à établir, car l'incubation de la listériose peut être longue (22) et la source alimentaire de l'infection est difficile à identifier.

Ce mode de contamination a été décrit :

- soit par des aliments consommés à l'hôpital,
- soit par transmission croisée, notamment par le biais de matériel contaminé par un enfant infecté (thermomètres, couveuses, huile de soins).

Le CNRL détecte par le biais d'un système d'alerte automatisée au sein de sa base de données les suspicions d'infections nosocomiales, définies par l'identification de plus de 2 cas en moins de 15 jours dans un même établissement de santé. Cette identification déclenche une notification à l'InVS et la comparaison des caractéristiques microbiologiques des souches concernées. Si les caractéristiques microbiologiques des souches sont identiques ou similaires, une enquête impliquant l'InVS, l'ARS, la DGAI/DDPP et le CNRL ainsi que le CLIN et l'hygiéniste hospitalier concernés est conduite pour identifier l'origine de l'infection.

Les cas de bactériémie ou de formes neuroméningées contractées chez des patients hospitalisés depuis plus de 15 jours et sans apport de nourriture extérieur entraîne une inspection de la cuisine hospitalière, et la réalisation de prélèvements alimentaires et de surface.

SURVEILLANCE MICROBIOLOGIQUE DE LA LISTERIOSE EN EUROPE

L'ECDC a mis en place un système volontaire d'investigations de cas groupés ou d'épidémies européens au moyen de la plateforme d'échanges EPIS (Epidemic Intelligence Information System), ouverte aux pays européens, mais également aux USA, au Canada, à l'Australie, la Nouvelle-Zélande, l'Afrique du Sud, la Turquie, l'Islande, la Norvège, le Liechtenstein et le Japon. Ce système permet un échange de données de typages et d'informations concernant les cas groupés et les épidémies.

La base européenne ECDC TESSY (European Surveillance System) regroupe les données épidémiologiques transférées de façon volontaire et non exhaustive par les agences de santé publique nationales. Cette base est complétée par TESSY MOL, dont l'objectif est de lier les données épidémiologiques des cas humains aux données microbiologiques correspondantes (génomérotypage et typage moléculaire PFGE) dans le but de rendre possible une surveillance microbiologique européenne et une détection précoce des cas groupés ou épidémies au sein des pays participants, en lien avec la plateforme EPIS.

Le Laboratoire de Référence de l'Union Européenne (LRUE) pour *Lm* coordonne un réseau de laboratoires nationaux de référence dont les méthodes de détection et d'énumération des *Lm* dans les échantillons de la chaîne alimentaire et de l'environnement agro-alimentaire, et les méthodes de typage moléculaire PFGE ont été harmonisées. Une base de données, sous l'égide de la DG-SANCO de l'Union Européenne, a été créée.

SURVEILLANCE MICROBIOLOGIQUE INTERNATIONALE DE LA LISTERIOSE

L'Unité de Biologie des Infections héberge le Centre Collaborateur de l'OMS des *Listeria* (<http://www.pasteur.fr/cnr/listeria>; http://apps.who.int/whocc/Detail.aspx?cc_ref=FRA-118&cc_city=paris&).

Ce mandat a été renouvelé le 30 novembre 2011 pour une période de 4 ans, sur les termes de référence (missions) suivants :

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

Le CCOMS peut constituer un appui scientifique et technique pour l'OMS et la FAO en cas d'épidémies ou de cas groupés au niveau international, et émettre des recommandations, avis ou rédiger des documents d'informations.

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) pour contribuer à la surveillance microbiologique internationale des *Listeria*. Cette surveillance internationale existe pour le typage moléculaire PFGE, grâce au réseau Pulsenet (29).

En 2013, le CCOMS des *Listeria* a effectué une enquête préliminaire pour définir les besoins du réseau international des Centres Nationaux de Référence des *Listeria*.

2.2. INTERACTIONS DU CNR AVEC LES DIFFERENTS ACTEURS NATIONAUX ET INTERNATIONAUX

InVS : Le CNRL est en lien quotidien avec l'InVS pour la surveillance nationale et le suivi de dossiers de souches humaines ou d'investigations, et pour la gestion de phénomènes anormaux.

DGS - DGAL -DGCCRF : Le CNRL est en lien pluri-hebdomadaire avec la DGAL dans le cadre du suivi des alertes-produits et des enquêtes sur les formes neuroméningées. Le CNRL participe à des réunions coordonnées par la DGS dans le cadre de gestion d'alertes, de cas groupés ou d'épidémies. Le CNRL, au sein de la cellule *Listeria*, est en lien direct et simultané avec la DGS, DGAL et la DGCCRF.

ANSES et LNRI: Le CNRL participe à l'examen de saisines DGS/DGCCRF/DGAL en tant qu'expert pour le CES « Evaluation des risques biologiques des aliments » de l'ANSES. Les CNRL et le LNRI pratiquent depuis 2008 un échange de souches de profils et d'alertes produits, et investiguent ensemble des sources possibles de contamination. En cas de nécessité, le CNRL et le LNRI dont les bases de typage moléculaire sont compatibles peuvent échanger rapidement des données de typage moléculaire dans le cadre d'investigation de cas groupés ou d'épidémies.

En 2013, 565 souches d'alertes-produits ont été envoyées par le CNRL au LNRI. Les profils PFGE *Ascl/Apal* des souches d'alertes-produits sont envoyés hebdomadairement au LNRI lors de la clôture de chaque surveillance microbiologique. Le CNRL effectue des comparaisons de profils de souches alimentaires de sa base avec celles du LNRI et réciproquement pour des clients privés. Le CNRL échange également avec les investigateurs en charge de la surveillance de la résistance aux antibiotiques des *Lm* d'origine alimentaire et animale (25).

Le CNRL et le LNRI participent à des projets de recherche communs (cf. chapitre 4).

Laboratoire de Référence des *Listeria monocytogenes* de l'Union Européenne (EU-RL): Créé en 2006 par la Commission Européenne, il est situé au laboratoire ANSES-LSA de Maisons-Alfort, également LNRI. Il s'intéresse à l'espèce *monocytogenes* du genre *Listeria*. Ses missions concernent les souches alimentaires et vétérinaires reliées aux zoonoses, l'antibiorésistance des souches zoonotiques et la mise au point de méthodes d'essais dans le domaine alimentaire et vétérinaire pour la détection, l'énumération et la caractérisation des *Lm*.

Le CNRL et l'EU-RL mènent des projets de recherche communs (cf. chapitre 4).

European Center for Diseases Control (ECDC) : Le CNRL a participé ou contribué activement en 2013:

- aux groupes de travail *Listeria* du réseau européen des maladies d'origine hydrique et alimentaire (FWD) de l'ECDC ;
- au First *Listeria* Working Group (28-29/11/14, Stockholm) d'ELITE (European *Listeria* Typing Exercise) pour établir la stratégie d'analyse des données humaines et alimentaires (Base-Line Study EFSA) et microbiologiques collectées en 2010-2011, et pour présenter une épidémie type française en 2013;
- à la notification des données françaises à la base ECDC TESSY (European Surveillance System), à la compatibilité de la base du CNRL avec la base Européenne TESSY Mol, 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);
- à l'investigation de 4 Urgent Inquiries (Alertes européennes);
- à la révision des rapports conjoints annuels EFSA-ECDC sur les zoonoses (EU Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012) et à leur mise à jour ;
- à la révision du rapport de l'essai d'intercomparaison EQA organisé par l'EURL *Lm* ;
- à l'essai d'intercomparaison des CNRs européens (EQA) en Mars et Octobre 2013 ;
- à une revue en cours de soumission avec C. Goessner de l'ECDC sur les « Urgent inquiries » en Europe entre 2008-2012 pour les maladies d'origine hydrique ou alimentaire.

Center for Diseases Control (CDC, USA) et Pulsenet: En 2013, le CNRL/CCOMS a été en lien avec le CDC d'Atlanta, en particulier le Dr Peter Gerner-Smidt afin d'investiguer des profils PFGE de souches humaines ou alimentaires des USA et leurs liens avec des souches alimentaires françaises.

En 2013, le CNRL/CCOMS a été invité au PulseNet International Strategic Planning Meeting (5-7/02/14, Stockholm-Helsinki) afin d'envisager la normalisation par l'Organisation internationale de Standardisation (ISO) de la méthode PFGE pour *Lm*, de définir l'avenir de la PFGE et son remplacement par le Whole Genome Sequencing au niveau international, ainsi que l'intégration de la surveillance microbiologique ECDC dans le réseau International Pulsenet.

Organisation Internationale de Normalisation (ISO) et Comité Européen de Normalisation (CEN) : En 2013, le CNRL a participé avec le LNRL aux réunions Afnor V08B, CEN TC275/WG6 et ISO TC34/SC9 sur la révision des méthodes de détection et d'énumération des *Lm* dans la chaîne alimentaire et a actualisé le schéma d'identification des souches de *Listeria spp.*

Office International des Epizooties (OIE) : En 2013, le CNRL a finalisé avec d'autres experts la révision du chapitre *Listeria monocytogenes* du Manuel terrestre de l'OIE, actuellement soumis aux Etats membres.

EC Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) : Le réseau RASFF de l'Union européenne est un outil d'échange d'informations sur les mesures prises pour garantir la sécurité alimentaire : les notifications d'alerte (produits alimentaires à risque sur le marché nécessitant une action immédiate) et notifications informatives (détection nationale d'une alerte ayant entraîné des mesures telles que le retrait ou le refus de produits alimentaires) sont transmises aux membres du réseau (DGAL, DGCCRF, InVS) qui les communiquent au CNRL.

Ce système est complété au niveau mondial par le réseau INFOSAN de l'OMS et le CNR/CCOMS est contacté pour expertiser certaines alertes avant leur envoi sur le réseau international. En 2013, le CNRL a participé à l'investigation de deux enquêtes RASFF avec communication des profils PFGE Ascl/Apal à son homologue CNR allemand.

Réseau national de laboratoires d'analyses : Le CNRL est en contact avec un réseau de 700 microbiologistes français et l'ensemble des laboratoires vétérinaires départementaux, de la DGCCRF, des laboratoires privés d'hygiène des aliments (environ 260 correspondants) dans le cadre de l'analyse des souches qui sont envoyées au CNRL et de la rétro-information décrite ci-après (cf. Chapitre 3.8).

2.3. DONNEES DE LA SURVEILLANCE MICROBIOLOGIQUE DE LA LISTERIOSE HUMAINE

A - DEFINITION DES CAS

Les cas de listériose humaine sont arbitrairement classés en listériose materno-néonatale et listériose non materno-néonatale, selon les critères suivants :

- Un cas de **listériose materno-néonatale** est un cas où *Lm* est isolée d'une culture d'un site, le plus souvent physiologiquement stérile, de la femme enceinte, du fœtus, des prélèvements périnataux ou du nouveau-né (≤ 28 jours). La mère et l'enfant comptent pour un cas.
- Un cas de **listériose non materno-néonatale** est un cas où une souche de *Lm* est isolée d'un site, le plus souvent physiologiquement stérile, chez un sujet de plus de 28 jours (femme enceinte exclue). Il peut s'agir :
 - d'une **forme septicémique (S)**: définie par la présence de *Lm* dans une hémoculture, en l'absence d'argument pour une atteinte neurologique ;
 - d'une **forme neurologique (N)**: définie par la présence de *Lm* dans la culture d'un liquide céphalo-rachidien (LCR), dans le contenu d'un abcès cérébral, ou dans une hémoculture chez un patient avec atteinte neurologique clinique ou neuroradiologique ;
 - d'une **autre forme (A)**: définie par la présence de *Lm* dans un prélèvement non fécal extra-sanguin et extra-cérébral.

B - ANALYSE GLOBALE DES CAS DE LISTERIOSE

Nombre total de cas

En 2013, le CNRL a reçu 415 souches humaines (394 en 2012) rattachées à 369 suspicions d'infections humaines déclarées (349 en 2012). La différence observée entre nombres de souches et de cas est liée à l'existence de doublons voire triplicats de souches (n=41) par patient, non pris en compte dans l'analyse finale.

Trois de ces cas ne répondaient pas à la définition de listériose. Il s'agissait :

- d'un homme avec un ECBU positif à *Lm* sur le premier prélèvement, mais pas sur le second ;
- d'une femme avec le prélèvement de l'ongle d'un orteil positif à *Lm*, considéré cliniquement comme contaminant;
- d'une femme avec listériose non invasive cutanée de la face, avec écoulement purulent d'une pustule positif à *Lm*. L'origine présumée de la contamination est une crème de soins artisanale contaminée avec des ingrédients alimentaires.

Pour trois autres cas, le CNRL n'a pas confirmé le diagnostic de listériose puisqu'il s'agissait d'une souche « non *Listeria* ».

En 2013, une selle de femme enceinte a été expertisée, mais aucune *Listeria* n'a été isolée. Aucun autre échantillon biologique clinique n'a été expertisé en 2013.

Au total, en 2013, le CNRL retient donc, après recoupement avec les données de l'InVS, 368 cas de listériose (343 en 2012) au jour du traitement statistique de ce rapport (dont 3 cas sans souche associée à la DO, car non reçues malgré relances des laboratoires de microbiologie à l'origine de la DO): 363 en France métropolitaine, 3 dans les DROM-TOM et 2 dans les Collectivités d'Outre-Mer (COM).

Taux d'exhaustivité

La surveillance de la listériose en France se fonde sur le recoupement de 2 sources complémentaires recensant les cas : la notification aux ARS (Déclaration Obligatoire) et l'envoi volontaire des souches par les microbiologistes au CNRL.

Une exhaustivité optimale est possible grâce :

- aux échanges journaliers de données entre l'InVS et le CNRL ;
- au point semestriel comparant les informations reçues par l'InVS et les souches reçues par le CNRL ;
- à la relance éventuelle des correspondants par les deux instances.

Le taux d'exhaustivité de réception des souches par rapport à l'ensemble des cas recensés est de 99,2% en 2013 (99,4% en 2012) (Figure 5).

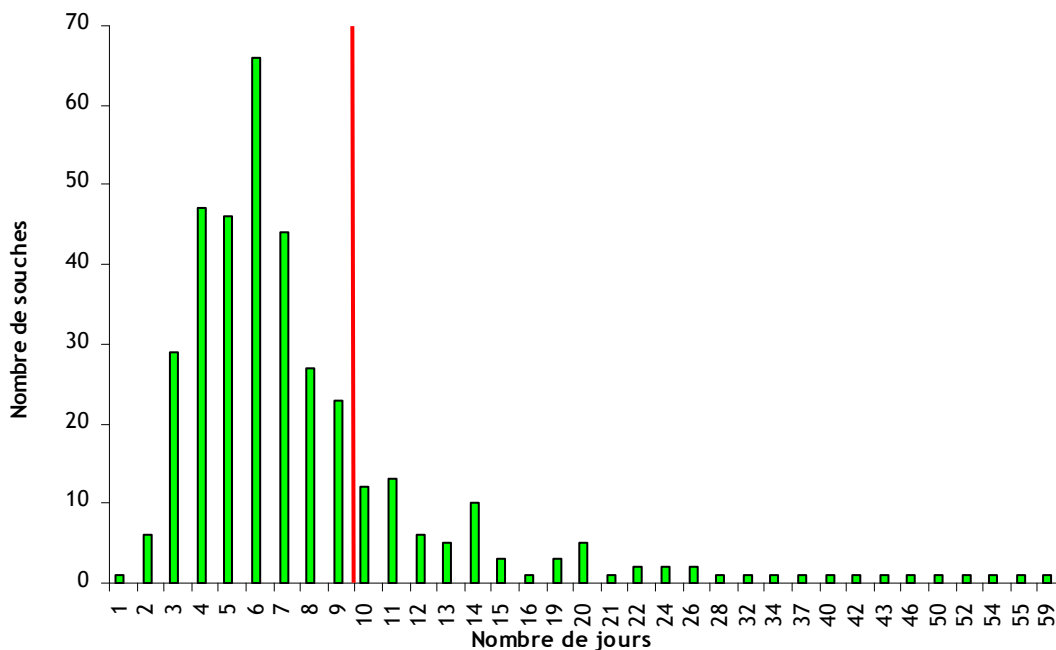
Laboratoires expéditeurs

Les laboratoires expéditeurs sont à 84% hospitaliers (86% en 2012), reflétant la sévérité habituelle de l'infection. Les autres structures sont des laboratoires privés (16%) (14% en 2012). Cette répartition est équivalente à celle de 2012 et concerne la France métropolitaine et les DOM-TOM-COM.

La détermination de l'espèce à *L. monocytogenes* par les laboratoires d'analyse médicale (LABM) est à 99,6% correcte. Il faut noter que la méthode MALDI-TOF identifie bien le genre *Listeria*, mais mal l'espèce *monocytogenes*, comme cela a été décrit dans une étude à laquelle a participé le CNRL (17).

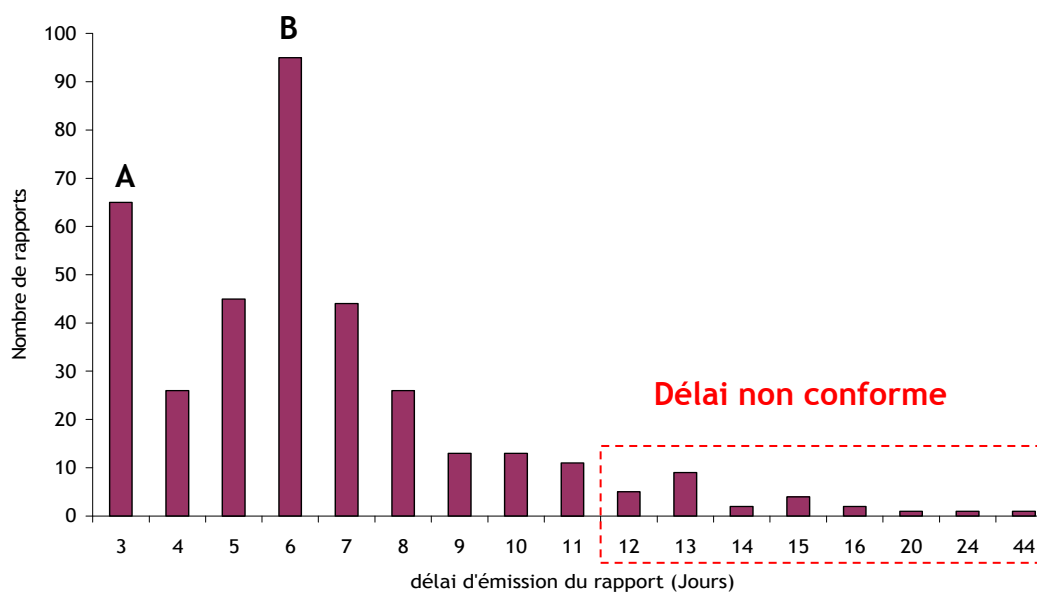
Le délai moyen entre date du prélèvement dont la souche a été isolée et réception au CNRL est de 9 jours (compris entre 1-59 jours) contre 10 jours depuis 2010 (Figure 3). La réduction de ce délai est un objectif de notre système qualité et du CNRL et nécessite des relances par l'InVS ainsi que les ARS et l'optimisation du système de transport pour les laboratoires ne disposant pas de circuits rapides spécifiques.

Figure 3. Distribution des souches d'origine humaine isolées en 2013 selon le délai entre le prélèvement et la réception au CNRL (médiane en rouge)



Le délai moyen entre réception de la souche au CNRL et envoi du rapport d'essai (contenant l'identification et le groupage PCR de la souche) a été de 6,5 jours (contre 6 j en 2012) avec un délai compris entre 1 et 44 jours (Figure 4). Le délai cible du système qualité du CNRL est de 6 jours. Conformément aux conditions analytiques du CNRL, ce délai peut s'allonger en raison de la nécessité de purification de la souche ou de la lecture sur 5 jours de l'hydrolyse des sucres en cas de tests phénotypiques complémentaires. Les délais non-conformes ont été liés à des rapports révisés (erreurs sur la lecture des renseignements manuscrits) ou à des difficultés techniques sur la détermination de l'utilisation de sucres.

Figure 4. Distribution des souches isolées en 2013 selon le délai entre la réception de la souche au CNRL et l'envoi du rapport d'essai (A, pic des rapports d'analyses sans week-end ; B, pic des rapports d'analyses avec week-end)



L'ensemble de ces résultats illustre la qualité du réseau de microbiologistes en lien avec le CNRL, leur prise en compte des enjeux de santé publique que représente l'isolement d'une *Lm*, et la contribution essentielle des microbiologistes médicaux à la surveillance microbiologique de la listériose. Cependant, le coût de l'envoi des souches semble pouvoir constituer un frein à leur envoi au CNRL.

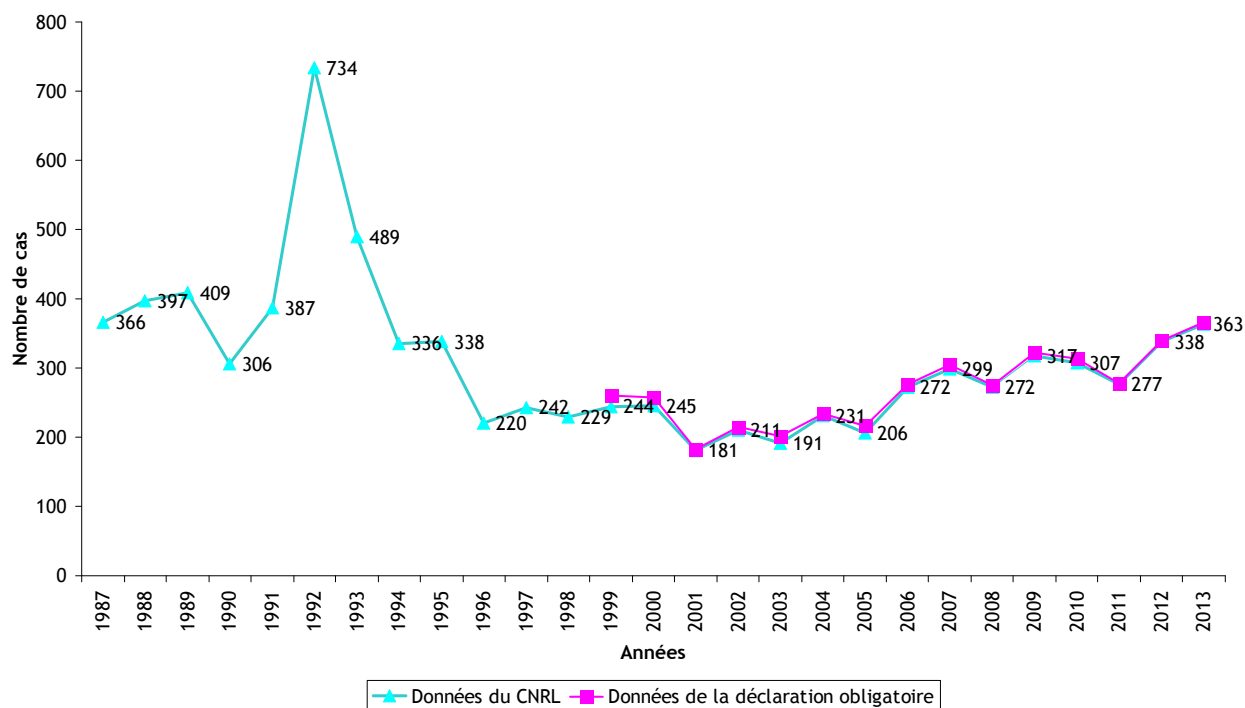
C - CAS DE LISTERIOSE EN FRANCE METROPOLITAINE

Le nombre de cas de listériose en France métropolitaine en 2013 est de 363, soit une augmentation de 7% par rapport à 2012 (338 cas en 2012).

L'évolution des 7 dernières années est marquée par 3 tendances successives, rapportées également dans le reste de l'Europe :

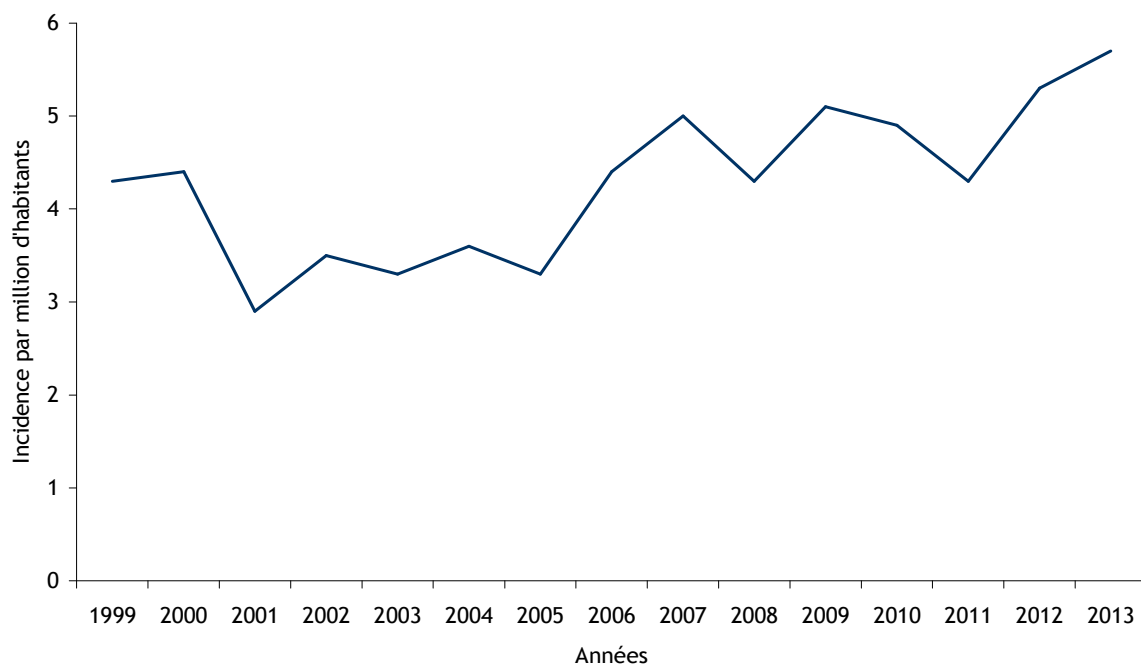
- Augmentation en 2006
- Stabilité entre 2007 et 2011
- Réaugmentation du nombre de cas en 2012, sans cause unique identifiée (ni dans le profil des souches, des contaminations alimentaires ni des patients) et avec un nombre total de cas proche des années épidémiques avant 1995.

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



L'incidence de la listériose humaine est de 5,7 cas par million d'habitants en 2013 (Figure 6).

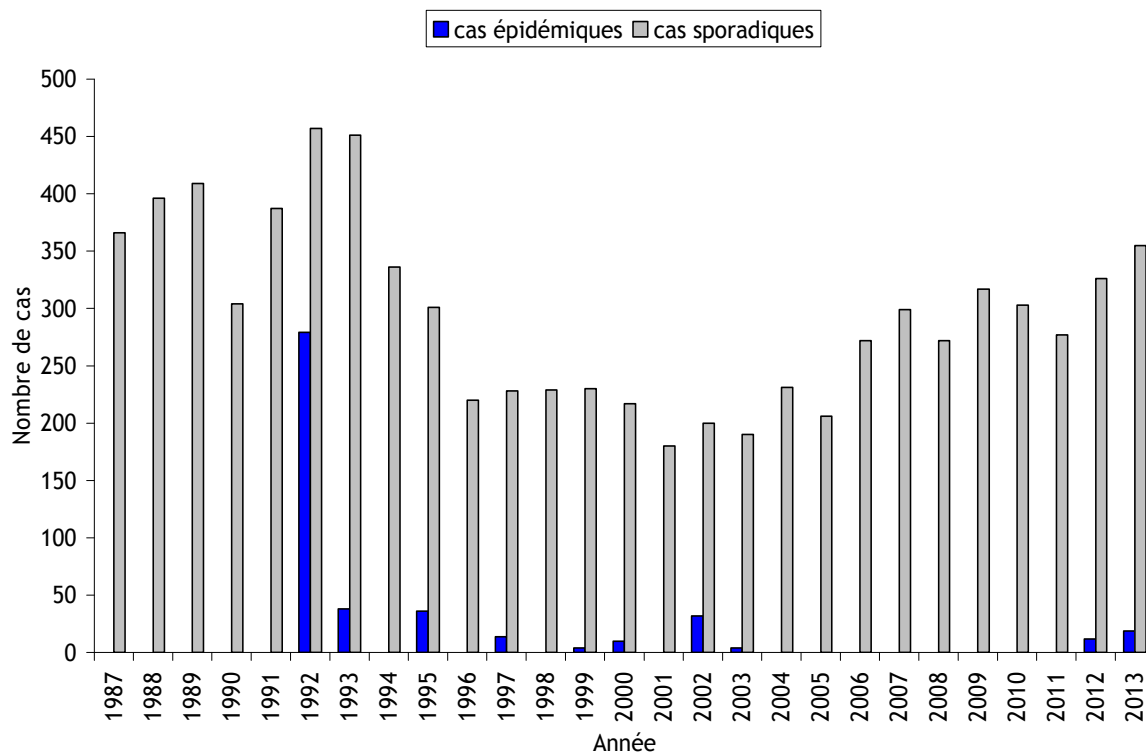
Figure 6. Incidence de 1999 à 2013 en France



En 2013, une toxi-infection alimentaire (4 cas) et 2 épidémies (13 cas humains au total) ont été recensées. L'évolution de la proportion de cas sporadiques et épidémiques est détaillée dans la Figure 7. La dernière épidémie avait été signalée en 2003.

L'analyse des dépassements de seuil et des périodes de surveillance renforcée est détaillée dans la suite de ce rapport.

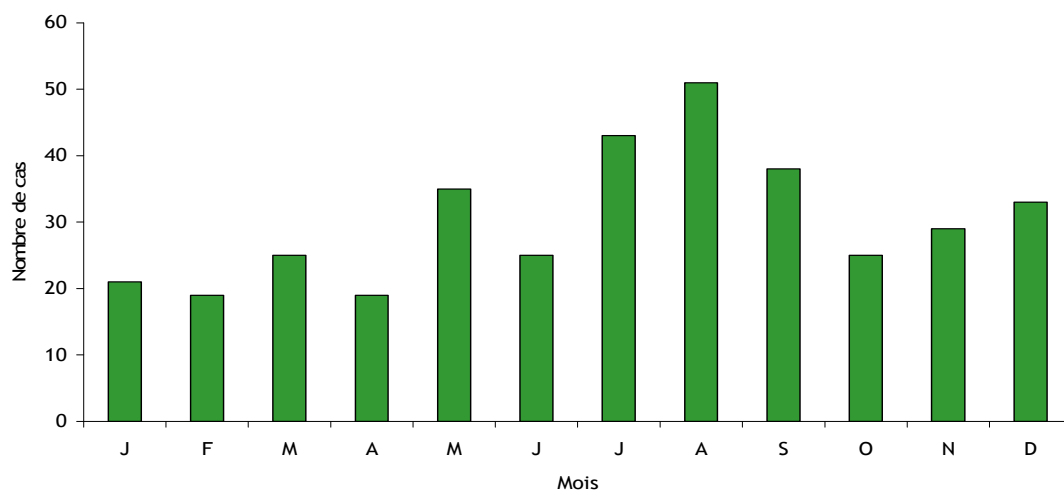
Figure 7. Nombre annuel de cas de listériose en France métropolitaine depuis 1987



Distribution temporelle des cas

La distribution mensuelle et trimestrielle des cas sporadiques pour l'année 2013 est présentée dans les Figures 8 et 9.

Figure 8 : Distribution mensuelle des cas sporadiques de listériose en France métropolitaine en 2013



Le plus grand nombre de cas a été observé au 3^{ème} trimestre 2013, comme pour les années 2006 à 2011, alors qu'il s'agissait du 2^{ème} trimestre en 2012. En 2013, les mois où l'incidence fut la plus forte furent août, juillet puis décembre. La distribution des cas varie d'une année à l'autre, mais il existe une tendance à l'augmentation des cas durant les mois de Janvier et la période estivale (Mai-Août) (Figure 9). La Figure 10 illustre qu'il ne semble pas exister de corrélation entre le nombre mensuel de souches d'alertes produits et nombre de cas.

Figure 9. Distribution mensuelle des cas sporadiques de listériose en France métropolitaine de 2007 à 2013

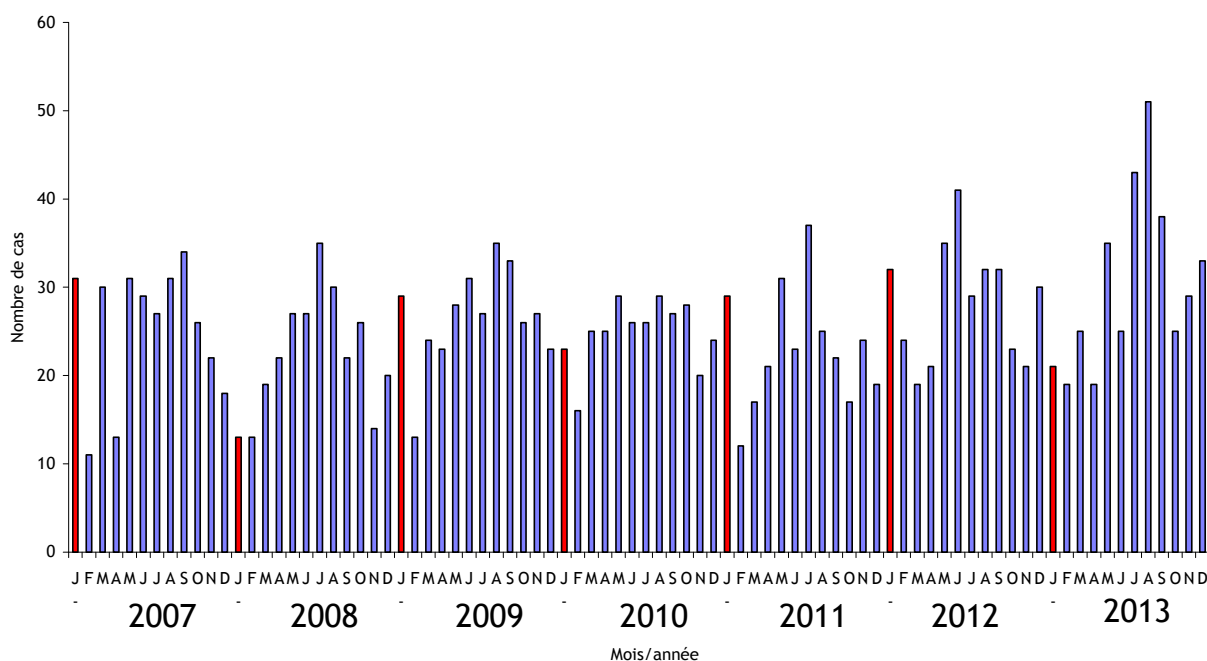
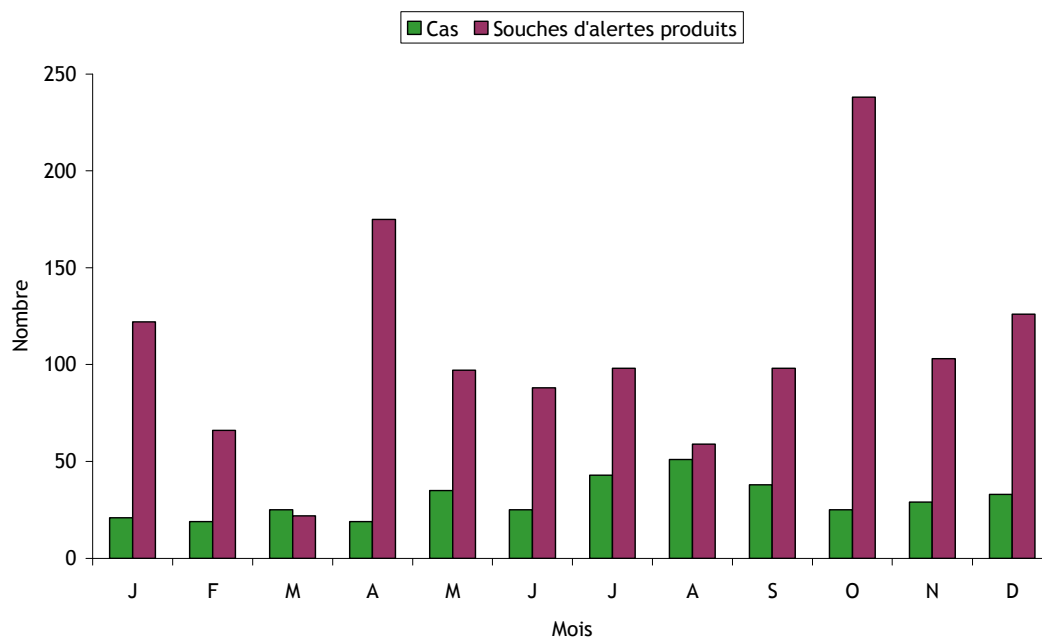


Figure 10. Distribution mensuelle des cas sporadiques de listériose et des souches alimentaires d'alertes produits en France métropolitaine en 2013



Distribution géographique

Par région

La distribution géographique du nombre de cas et les incidences régionales sont présentées dans les Figures 11 et 12 et le Tableau 2. Les chiffres d'incidence sont exprimés en cas par 10^6 habitants et par région et sont calculés à partir des chiffres de population par région évalués par l'INSEE.

- Les régions avec les incidences les plus élevées en 2013 sont : Basse-Normandie ($8,7/10^6$), Rhône-Alpes ($7,3/10^6$), Nord Pas de Calais ($7,2/10^6$) et Haute-Normandie ($7/10^6$) alors que l'incidence dans cette dernière était la plus basse en 2011 et 2012.

- Les régions avec l'incidence la plus basse en 2013 sont la Lorraine ($2,1/10^6$) comme en 2012 et le Limousin ($2,7/10^6$).

- Les régions avec le plus grand nombre de cas, en valeur absolue, sont comme attendues les plus peuplées : Ile-de-France (59) et Rhône-Alpes (46). Les régions caractérisées par les plus faibles nombres de cas, en valeur absolue, sont la Corse (2) et le Limousin (3).

Figure 11. Incidences régionales des cas de listériose de 2013
(incidence / 10⁶ habitants / par région)

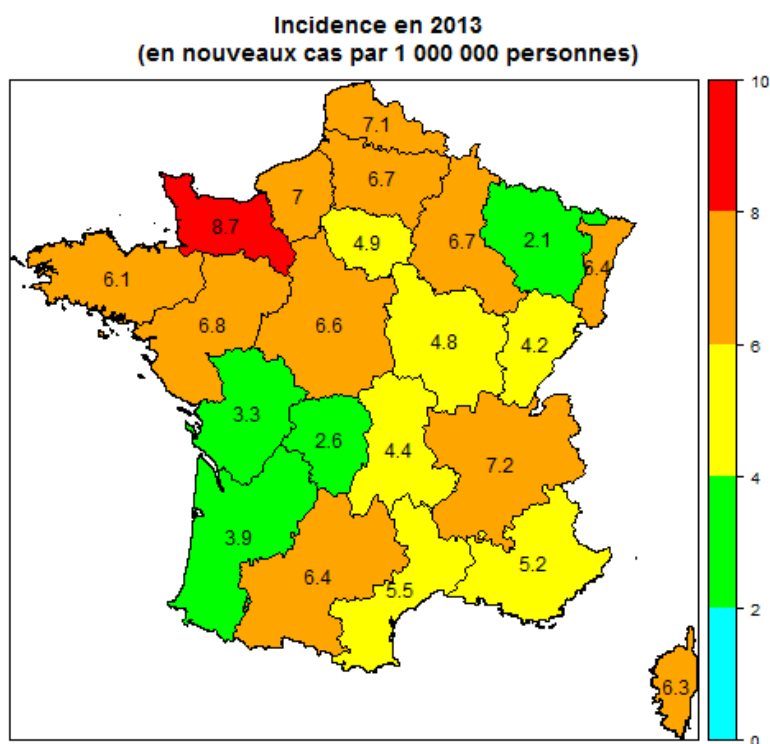
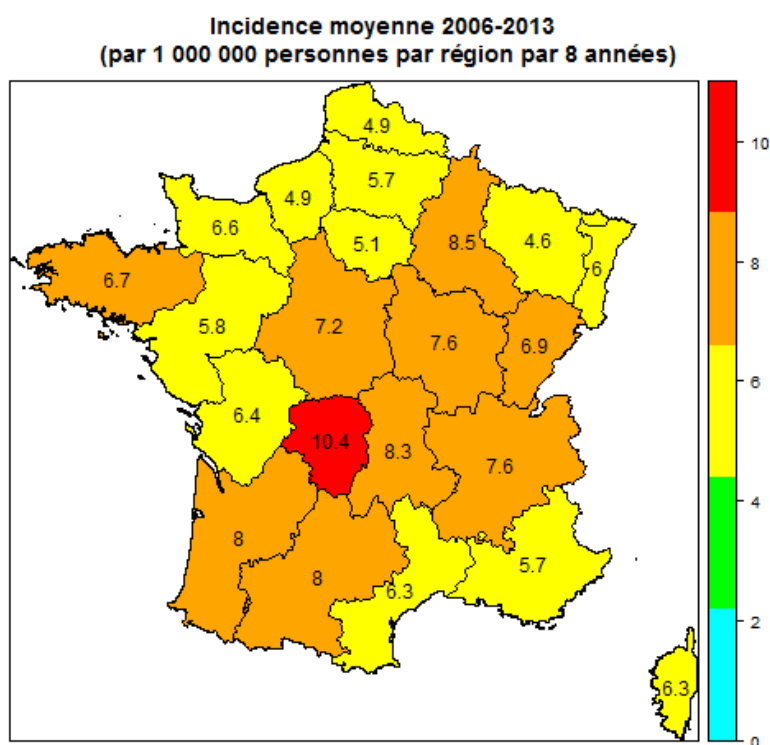


Figure 12. Incidences régionales annuelles moyennes de listériose pour la période 2006-2013
(incidence / 10⁶ habitants / par région)



Les incidences régionales moyennes des cas de listériose de 2006 à 2013 montrent que le Limousin et l'Auvergne sont les régions avec les plus fortes incidences.

Par département

- Les départements avec les incidences les plus élevées en 2013 sont : Ardèche (16,7/10⁶) et Corse du Sud (16/10⁶).
- Les départements caractérisés par les incidences les plus basses en 2013 sont : 15 départements pour lesquels l'incidence est nulle (5-16-19-20-21-23-28-35-40-48-55-66-79-90-2B), Pyrénées Atlantiques (1,6/10⁶) et Vaucluse (1,9/10⁶).
- Les départements caractérisés par les plus grands nombres de cas, en valeur absolue, sont le Nord (19), le Rhône (14) et les Bouches-du-Rhône (13).

Tableau 2. Distribution régionale des cas sporadiques de listériose diagnostiqués en France métropolitaine depuis 2005

Région	Année								
	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013
ALSACE	7	8	12	12	7	8	7	9	12
AQUITAINE	13	16	32	20	19	20	20	25	13
AUVERGNE	1	6	8	5	8	5	10	8	6
BASSE-NORMANDIE	6	2	10	5	7	9	7	7	13
BOURGOGNE	5	9	7	7	10	10	7	10	8
BRETAGNE	13	16	15	14	15	20	19	23	20
CENTRE	7	11	8	7	16	13	10	24	17
CHAMPAGNE-ARDENNE	3	7	3	7	7	5	12	6	9
CORSE	2	4	3	0	0	1	1	3	2
FRANCHE-COMTE	4	2	1	1	6	5	8	4	5
HAUTE-NORMANDIE	5	7	4	6	10	9	1	6	13
ILE-DE-FRANCE	36	42	63	44	58	62	49	52	59
LANGUEDOC-ROUSSILLON	7	10	7	14	17	13	9	10	15
LIMOUSIN	1	2	6	2	4	6	4	7	2
LORRAINE	11	7	2	8	10	10	5	5	5
MIDI-PYRENEES	18	25	17	17	12	8	12	17	19
NORD-PAS-DE-CALAIS	15	11	21	12	15	17	21	24	29
PAYS DE LA LOIRE	9	11	4	11	9	11	14	14	25
PICARDIE	3	12	7	6	10	4	4	9	13
POITOU-CHARENTES	2	6	8	5	9	6	6	11	6
PROVENCE-ALPES-COTE-D'AZUR	16	31	19	18	25	15	23	20	26
RHONE-ALPES	18	26	42	47	43	41	28	45	46
Total	202	271	299	268	317	298	277	339	363

Analyse par forme clinique

Les formes cliniques décrites dans ce chapitre et le Tableau 3 sont celles retenues après concertation avec l'INVS.

Tableau 3. Répartition des formes cliniques de 2006 à 2013

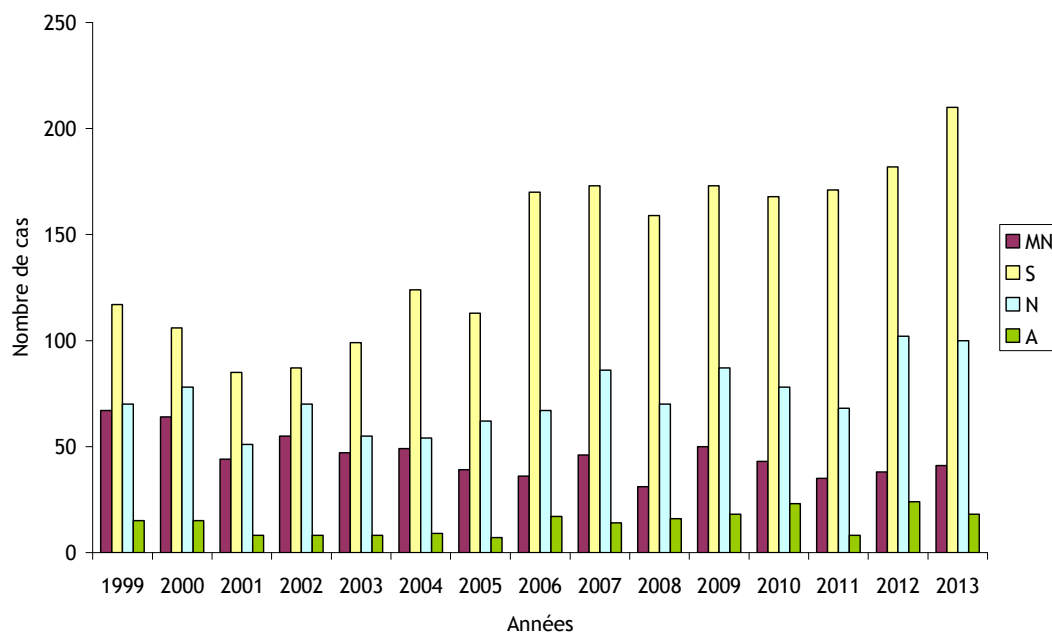
	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	Total
Formes non materno-néonatales									
Septicémies	170 (71%)	180 (69%)	152 (63%)	170 (62%)	156 (61%)	180 (73%)	169 (56%)	207 (64%)	1391
Infections neurologique	54 (22%)	69 (26%)	70 (29%)	85 (31%)	73 (29%)	57 (23%)	104 (35%)	98 (30%)	604
Autres formes	16 (7%)	12 (5%)	19 (4%)	19 (7%)	26 (10%)	9 (4%)	27 (9%)	18 (6%)	145
Total	240	261	241	274	255	246	300	323	2140
Formes materno-néonatales									
Total	31 (11%)	42 (14%)	27 (10%)	45 (14%)	43 (14%)	31 (11%)	38 (11%)	40 (11%)	297
Total des formes cliniques	271	303	268	319	298	277	338	363	2437

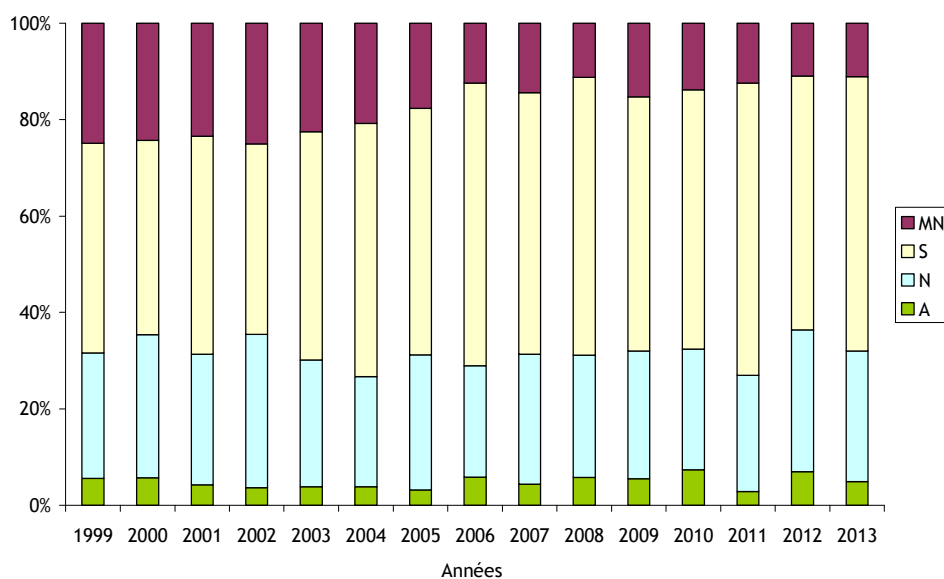
Formes materno-néonatales

En 2013, 40 formes materno-néonatales ont été enregistrées, représentant 11 % du total de cas sporadiques (Figure 13, Tableau 3).

Leur nombre a fortement décru depuis 1999 (-38%) et est stable depuis 2008 autour de 40 cas annuels, représentant 10 à 15% du total des cas invasifs. Ceci illustre le bénéfice initial et les limites actuelles de la stratégie de prévention fondée sur les recommandations alimentaires.

Figure 13. Nombre de cas et distribution des cas sporadiques de listériose en France métropolitaine depuis 1999 selon la forme clinique





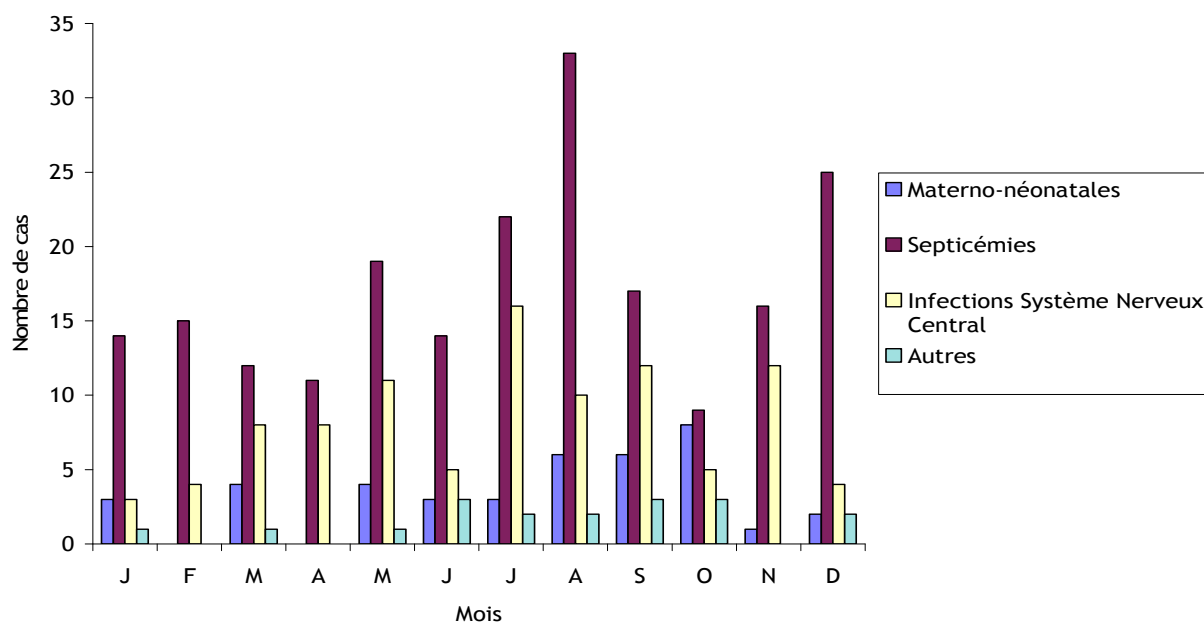
La répartition mensuelle des cas diagnostiqués en 2013 est présentée en Figure 14. La distribution par région des formes materno-néonatales est indiquée dans le Tableau 4.

Depuis 1999, les régions Ile de France et Rhône-Alpes rassemblent 50% des cas MN ; alors qu'elles ne concentrent que 32% des naissances et grossesses en France (http://www.insee.fr/fr/themes/tableau.asp?reg_id=8&ref_id=poptc02201). Ceci pourrait suggérer l'existence d'une exposition particulière à *Lm* dans les populations de ces régions, et justifier des actions ciblées dans la prévention de la listériose.

Formes non materno-néonatales

En 2013, 323 formes non materno-néonatales ont été enregistrées (300 en 2012), soit 89 % du total des cas sporadiques. Le Tableau 3 indique la répartition de ces formes non materno-néonatales.

Figure 14. Distribution mensuelle des cas sporadiques de listériose en France métropolitaine en 2013 selon la forme clinique



- La proportion et le nombre absolu d'infections du système nerveux central ont augmenté depuis 2012, après une période de stabilité depuis 2000. On compte environ 100 cas / an depuis deux ans, contre 40 à 60 cas/an de 2006 à 2011 (Tableau 3).

Tableau 4. Distribution régionale des cas sporadiques de listériose en France Métropolitaine en 2013 selon la forme clinique

Région	Total	Formes materno-néonatales	Septicémies	Infections du Système Nerveux Central	Autres
ALSACE	12	1	6	2	3
AQUITAINE	13	0	7	6	0
AUVERGNE	6	0	6	0	0
BASSE-NORMANDIE	13	1	11	1	0
BOURGOGNE	8	1	3	2	2
BRETAGNE	20	2	12	5	1
CENTRE	17	2	11	3	1
CHAMPAGNE-ARDENNE	9	0	7	2	0
CORSE	2	0	1	1	0
FRANCHE-COMTE	5	0	4	1	0
HAUTE-NORMANDIE	13	1	9	3	0
ILE-DE-FRANCE	59	15	23	17	4
LANGUEDOC-ROUSSILLON	15	2	7	5	1
LIMOUSIN	2	0	2	0	0
LORRAINE	5	0	5	0	0
MIDI-PYRENEES	19	2	13	4	0
NORD-PAS-DE-CALAIS	29	3	15	10	1
PAYS DE LA LOIRE	25	2	17	5	1
PICARDIE	13	1	8	3	1
POITOU-CHARENTES	6	0	2	4	0
PROVENCE-ALPES-COTE D'AZUR	26	5	13	8	0
RHONE-ALPES	46	2	25	16	3
Total	363	40	207	98	18

- L'augmentation des cas de listériose en 2013 par rapport à 2012 est essentiellement liée à l'augmentation du nombre de cas des formes septicémiques. Celui-ci est voisin de ceux observés entre 1992 et 1995. Ce sont ces formes cliniques qui avaient déjà le plus contribué à l'augmentation du nombre total de cas observés en 2006-2007. Cette augmentation pourrait, comme proposé pour les formes neurologiques, refléter l'augmentation du nombre de personnes à risque de développer une listériose invasive.

- Les formes cliniques « autres » représentent 6 % des cas non materno-néonatales. Le Tableau 5 décrit la répartition de ces infections de 2006 à 2013.

Tableau 5. Répartition des autres formes cliniques de 2006 à 2013

Autres formes	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	Total
Vasculaire	1	4	0	1	0	2	1	1	10
Adénopathie	1	0	0	0	1	0	1	1	4
Endocardite	2	0	0	1	0	0	0	1	4
Os/articulaire	4	3	8	7	4	2	5	6	39
Digestive	0	1	0	0	1	1	3	1	8
Foie	1	0	2	2	1	0	0	0	6
Œdème	1	1	2	2	6	0	0	0	12
Erysipèle	0	0	0	1	0	0	0	0	1
Infection d'ascite	5	3	6	3	10	3	12	7	49
Infection urinaire	0	0	0	1	1	0	2	0	4
Pneumopathie	0	0	1	1	2	1	3	1	9
Prostatite	1	0	0	0	0	0	0	0	1
Total	16	12	19	19	26	9	27	18	147

Les infections ostéoarticulaires et biliaires ont fait l'objet d'analyses spécifiques publiées (7) ou soumises pour publication.

Terrain

Des renseignements cliniques accompagnent la souche. Il s'agit d'informations collectées par le biologiste au moment de l'envoi de la souche qui ne sont pas nécessairement exhaustives. Ces données ne sont renseignées que dans 89 % des cas (stable depuis 2010). Dans 57% des cas renseignés (2012 : 60%), une ou plusieurs pathologies sous-jacentes sont rapportées : cancer, cirrhose, éthyliste, diabète, dialyse, infection par le VIH, transplantation d'organe et traitement immunosuppresseur (20).

Age et sexe des patients avec listériose

L'âge moyen des patients pour les formes non MN est de 70 ans en 2013 (de 1 à 95 ans), contre 72 ans en 2012 (Tableau 6).

57% (2012 : 58%) des formes non MN concernaient des hommes.

Tableau 6. Age des patients (médiane) de 1999 à 2013 (Modifié de M. Tourdjman, InVS)

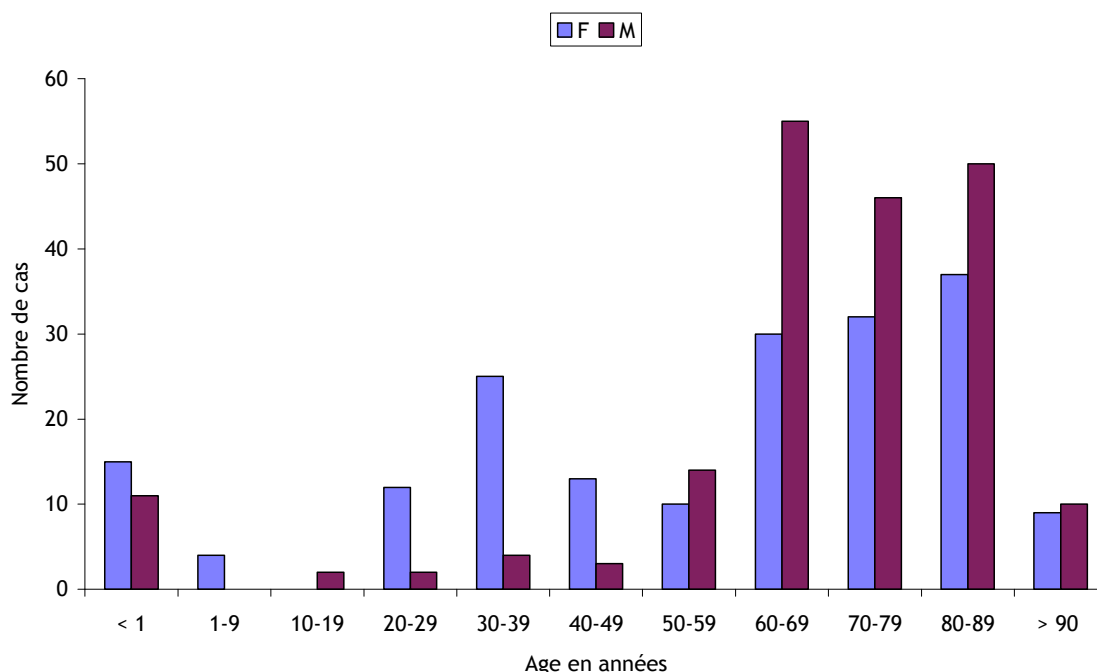
Année	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013
Age (médiane)	62	62	65	59	64	65	66	68	68	70	67	68	72	70	69

La répartition par tranche d'âge des formes non MN est présentée dans le Tableau 7 et la Figure 15. 83% des formes non MN sont survenue après 60 ans et 33 % après 80 ans en 2013. Pour les personnes de plus de 60 ans, on note une prédominance masculine.

Tableau 7. Distribution par classe d'âge, sexe et forme clinique des formes non materno-néonatales sporadiques en France métropolitaine en 2013

Sexe	Classe d'âge	Total	Infections du système nerveux central		
			Septicémies	Autres formes	
F	> 28 jours-20 ans	4	3	1	0
	21-60 ans	25	8	16	1
	60-80 ans	62	16	46	0
	> 80 ans	46	13	31	2
M	> 28 jours-20 ans	2	2	0	0
	21-60 ans	23	10	10	3
	60-80 ans	101	35	56	10
	> 80 ans	60	11	47	2
Total (sex ratio)	> 28 jours-20 ans	6 (0,5)	5 (0,7)	1 (0)	0
	21-60 ans	48 (0,9)	18 (1,2)	26 (0,6)	4
	60-80 ans	163 (1,6)	51 (2,2)	102 (1,2)	10
	> 80 ans	106 (1,3)	24 (0,8)	78 (1,7)	4

Figure 15. Distribution par classe d'âge et par sexe des formes sporadiques de listériose en France métropolitaine en 2013



Le sexe ratio M/F était de 1,4 en 2013 comme en 2012, alors qu'il est de 0,8 dans la population française âgée de moins de 60 ans. Cette prédominance masculine marquée de la listériose septicémique et neurologique est à ce jour inexplicée: rôle des comorbidités associées? Exposition éthylo-tabagique accrue? Exposition accrue à des aliments contaminés? Prédilection génétique liée

au sexe? Les données de l'étude MONALISA pourraient permettre d'avancer dans la compréhension de cette observation.

D - Analyse microbiologique

Analyses par groupe PCR

Analyse générale

Les résultats obtenus pour les 363 souches d'origine humaine de France métropolitaine sont présentés dans le Tableau 8.

Le CNRL n'a pas identifié de nouveaux profils de groupe PCR pour les souches d'origine humaine. Cependant, 2 cas humains étaient dus à une souche du variant V1 du Groupe PCR IVb (36).

En 2012, comme depuis 2006, le groupe PCR majoritaire est le IVb, représentant 51% des souches, suivi du IIA puis IIb puis IIc. Depuis 2006, il y a équilibre entre la proportion de groupe PCR IVb et non IVb. Cette répartition est différente de celle observée pour les souches alimentaires, où le groupe PCR IIA est majoritaire (cf. Figure 22).

Tableau 8. Répartition des groupes PCR par année depuis 2006

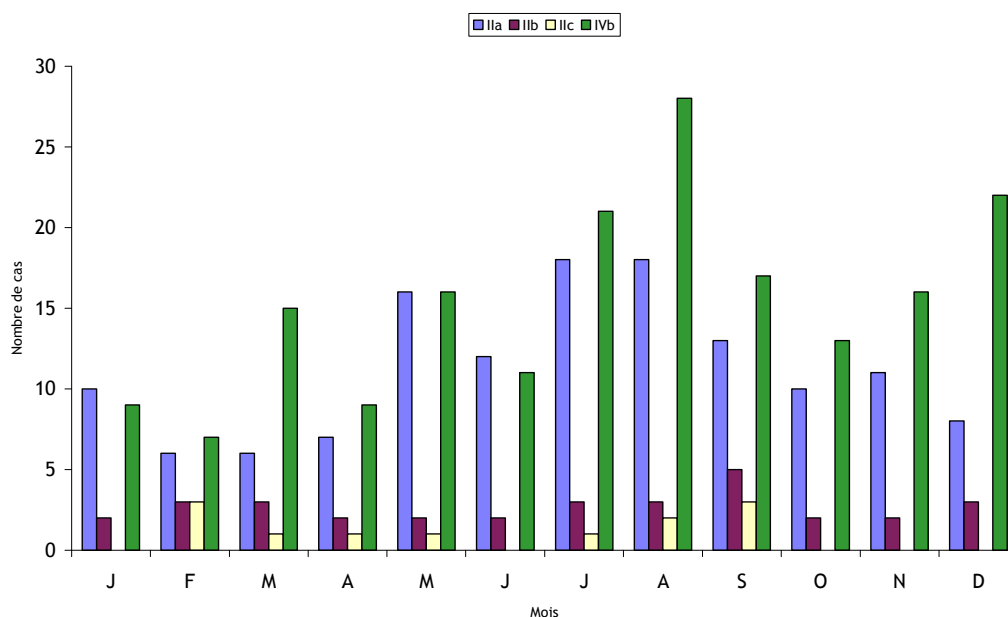
Groupe PCR	Souches du sérovar	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013
IIa	1/2a ou 3a	79 (29%)	90 (30%)	89 (33%)	88 (28 %)	100 (34%)	85 (31%)	98 (29%)	135 (37%)
IIb	1/2b, 3b ou 7	47 (17%)	45 (15%)	27 (10%)	47 (14 %)	40 (13%)	40 (14%)	43 (13%)	32 (9%)
IIc	1/2c ou 3c	11 (4%)	14 (5%)	11 (4%)	24 (8 %)	5 (2%)	6 (2%)	12 (3%)	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%)	182+2 (51%)
L	4ab ou 4c ou 4a	0 (0%)	1 (<1%)	0 (0%)	1 (<1 %)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Total		271	303	268	319	298	277	338	363

* variant du Groupe PCR IVb

Distribution temporelle des groupes PCR

La distribution mensuelle des 5 principaux groupes PCR ne semble pas mettre en évidence de saisonnalité pour les groupes PCR considérés (Figure 16).

Figure 16. Distribution mensuelle des souches de *L. monocytogenes* des 4 principaux groupes PCR responsables de cas sporadiques de listériose en France métropolitaine en 2013



Distribution régionale des groupes PCR

La distribution régionale des souches par groupe PCR (Tableau 9) ne met pas en évidence de distribution particulière.

Tableau 9. Distribution régionale des cas sporadiques de listériose en France métropolitaine en 2013 selon les groupes PCR

Région	Total	IIa	IIb	IIc	IVb
ALSACE	12	4	2	0	6
AQUITAINE	13	7	1	1	4
AUVERGNE	6	0	0	0	6
BASSE-NORMANDIE	13	6	2	0	5
BOURGOGNE	8	3	0	0	5
BRETAGNE	20	7	3	0	10
CENTRE	17	2	1	1	13
CHAMPAGNE-ARDENNE	9	6	0	0	3
CORSE	2	0	0	0	2
FRANCHE-COMTE	5	1	0	0	4
HAUTE-NORMANDIE	13	7	2	1	3
ILE-DE-FRANCE	59	15	7	2	35
LANGUEDOC-ROUSSILLON	15	3	1	0	11
LIMOUSIN	2	1	0	0	1
LORRAINE	5	3	0	0	2
MIDI-PYRENEES	19	9	1	3	6
NORD-PAS-DE-CALAIS	29	12	1	0	16
PAYS DE LA LOIRE	25	7	2	1	15
PICARDIE	13	4	5	1	3
POITOU-CHARENTES	6	2	0	0	4
PROVENCE-ALPES-COTE D'AZUR	26	11	1	1	13
RHONE-ALPES	46	25	3	1	17
Total	323	135	32	12	182

Distribution des groupes PCR selon la forme clinique (Figures 17 et 18)

Comme de 2006 à 2011, les souches du groupe PCR IVb (souches de sérovar 4b, 4d ou 4e) sont majoritaires en 2013, sauf pour les formes septicémiques (Tableaux 10 à 13).

Comme le montrent les figures 18 et 19, les deux groupes PCR majeurs pour les septicémies sont le IIa et le IVb. Pour les infections du système nerveux central, le groupe PCR majeur est le IVb puis le IIa. Pour les formes materno-néonatales, le groupe PCR majoritaire est le IVb suivi par le IIa et le IIb dans des proportions proches. Le groupe PCR IIc est rarement responsable de listériose, et très rarement de forme néonatale ou neurologique.

Tableau 10. Répartition des groupes PCR des souches selon les formes cliniques en 2013

	Materno-néonatale	Septicémie	Infections du système nerveux central	Autres formes	Total
IIa	4	93	30	8	135
IIb	3	22	4	3	32
IIc	0	8	4	0	12
IVb + IVb-v1*	32+1	83+1	60	7	182+2
L	0	0	0	0	0
Total	40	207	98	18	363

* variant Groupe PCR IVb

Figure 17. Distribution des groupes PCR IIa, IIb, IIc et IVb des souches de *L. monocytogenes* en fonction des formes cliniques en France métropolitaine de 2006 à 2013

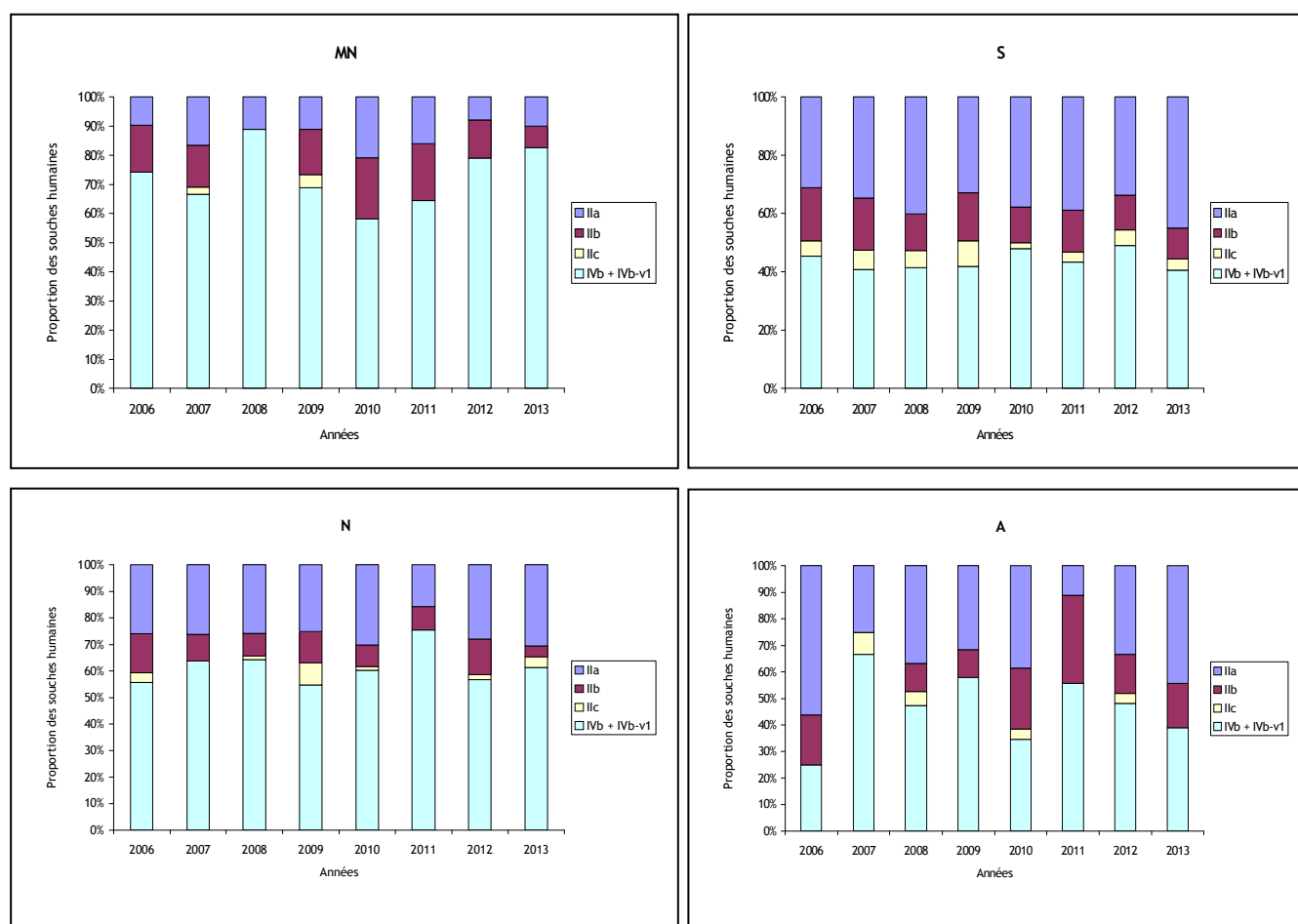
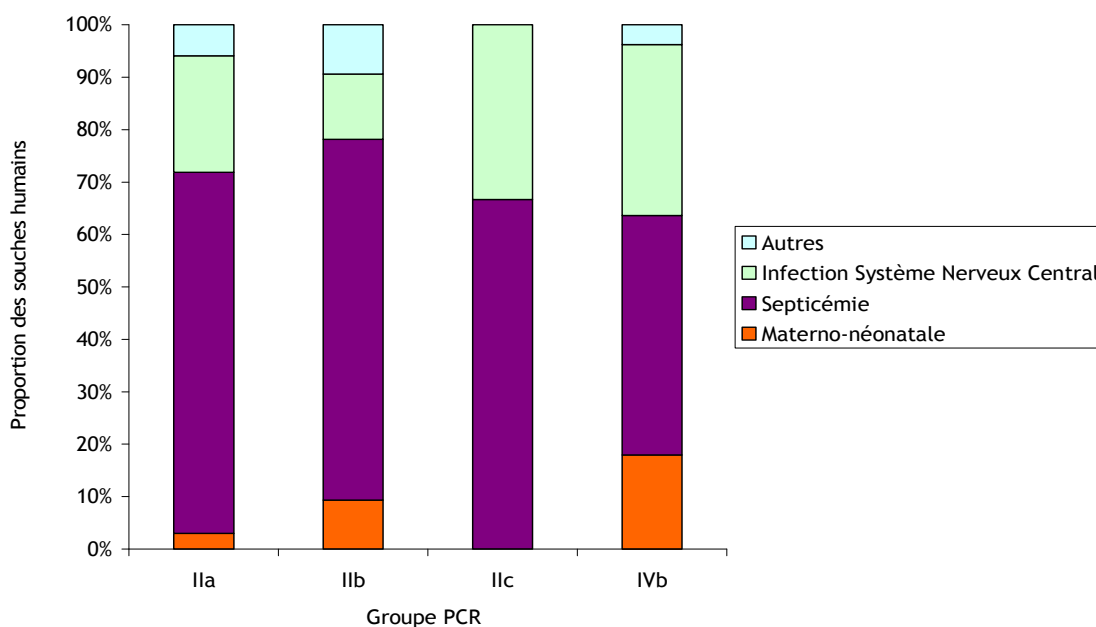


Figure 18. Distribution des groupes PCR des souches de *L. monocytogenes* en fonction des formes cliniques en France métropolitaine en 2013



Aucune corrélation entre l'âge du patient et le groupe PCR n'a été identifiée.

Cas de listériose dans les DROM-TOM-COM

En 2013, 3 cas sporadiques de listériose (2 formes neuroméningées et une forme materno-néonatale) ont été notifiés pour des patients résidant à la Réunion, et 2 cas (une forme neuroméningée et une forme materno-néonatale) en Polynésie française.

Etude de la résistance aux antibiotiques

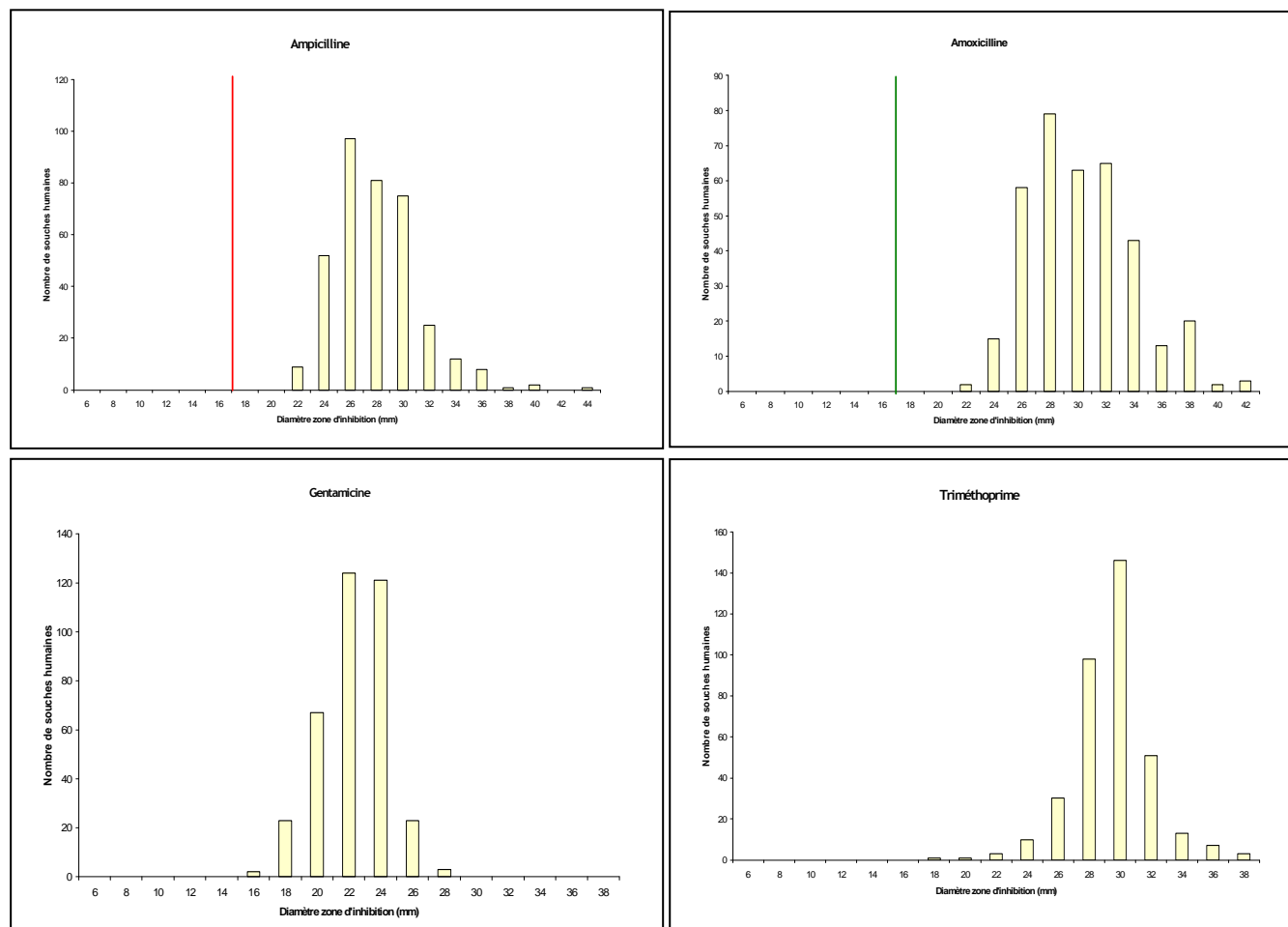
Toutes les souches présentaient une résistance naturelle *in vitro* à la céfotaxime, la clindamycine, aux sulfonamides, à la fosfomycine et l'acide nalidixique.

Toutes les souches étaient en 2013 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. En 2013, aucune souche humaine n'était limite en sensibilité pour l'amoxicilline et l'ampicilline (Figure 19) (41).

Toutes les souches étaient très majoritairement sensibles à l'érythromycine, au linézolide, à l'acide fucidique, la vancomycine, et au chloramphénicol. Cependant, il a été constaté une souche résistante à l'érythromycine, une souche résistante au chloramphénicol, une souche résistante contact à la ciprofloxacine et deux souches résistantes contact à la tétracycline.

Les souches avec des résistances atypiques non décrites seront étudiées en collaboration avec le CNR de la résistance aux antibiotiques.

Figure 19. Distribution des diamètres des zones d'inhibition pour l'ampicilline, l'amoxicilline, la gentamicine et le triméthoprimé en 2013 (Légende : le trait rouge indique la valeur de référence EUCAST définissant la résistance ; le trait vert signale la valeur de référence CLSI; il n'existe pas de valeur de référence avec la concentration des disques utilisés au CNR pour le triméthoprimé et pour la gentamicine).



Des souches d'origine non clinique dans la littérature résistante à l'ampicilline ou à la gentamicine ont été décrites (34). Cependant ces données n'ont pas été confirmées par d'autres investigateurs. Ces souches ont été demandées aux investigateurs qui les ont décrites, mais nous ne les avons pas reçues à ce jour. Dans le cadre de la surveillance microbiologique française, aucune observation similaire n'a été faite en France parmi les souches cliniques. Les conséquences de l'émergence d'une telle résistance seraient majeures dans la mesure où l'amoxicilline est l'antibiotique de référence pour le traitement de la listériose recommandé en première intention (6, 31).

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 rapporté (9).

Typage moléculaire des souches par macrorestriction d'ADN

La méthode est détaillée dans l'annexe C.

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

Vingt pulsotypes combinés *Ascl/Apal* ont occasionné plus de 3 cas humains en France en 2013 (Tableau 11), dont 12 appartiennent aux 22 pulsotypes ayant occasionné des dépassements de seuil depuis 2006 (année de changement de la définition du dépassement de seuil) (Tableau 12).

En 2013, un seul nouveau profil (M-IVb-141107/200792) a été responsable d'un dépassement de seuil et a été à l'origine d'une épidémie. Ce profil avait été identifié en 2012 dans les profils les plus souvent (n>3 cas humains avec ce profil dans l'année) rencontrés chez l'homme.

Analyse des profils de macrorestriction d'ADN des souches humaines

Le Tableau 11 présente les fréquences des pulsotypes des souches humaines en 2013.

Quelle que soit la forme, le profil M-IVb-210792-210792 du groupe IVb est majoritaire. La diversité des profils est plus importante dans les infections septicémiques que dans les autres formes (N, MN et A).

Le profil M-IVb-151005-111206 était un des principaux profils (n>3 cas humains avec ce profil dans l'année) en 2012, mais non en 2013. Le profil M-IVb-180110-190110 impliqué dans des dépassements de seuil lors du premier semestre 2012 et mis sous surveillance par le CNRL n'a pas été un des principaux en 2013.

Les pulsotypes identifiés dans les infections humaines constituent un sous ensemble des souches d'origine alimentaire ou environnementale.

Une décroissance du nombre de nouveaux profils est observable (Tableau 13), elle reflète la représentativité croissante de la base de données de pulsotypes du CNRL.

Tableau 11. Classement par ordre de fréquence des pulsotypes des souches humaines de 2013 (fréquence > 3 souches humaines)

Profils de macrorestriction (Espèce-Groupe PCR-Pulsovar <i>Ascl-Apal</i>)	Total souches humaines	Total souches par formes cliniques*				Présence dans un dépassement de seuil
		S	N	A	MN	
M-IVb-210792-210792	46	17	17	2	10	L06/02, L07/07, L08/03, L08/07, L09/06, L10/04, L10/09, L10/11, L11/05, L11/08, L12/02, L12/13, L13/03, L13/08
M-IVb-200792-200792	22	7	8	2	5	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-IIa-010901-020701	21	15	6	0	1	L06/03, L06/10, L07/08, L07/12, L09/11, L13/01, L13/05, L13/10
M-IVb-151005-151005	17	10	6	0	1	L06/04, L07/04, L08/06, L09/09, L10/05, L10/12, L11/07, L11/09, L12/07
M-IVb-011001-160602	15	11	2	1	1	L06/11, L07/13, L08/02, L09/02, L09/05, L09/10, L11/06, L12/08, L13/02, L13/06
M-IVb-141107-200792	9	1	4	0	4	L13/07
M-IIa-050207-050207bis	9	5	3	0	1	L12/11, L13/11
M-IVb-270801-050506	9	5	3	0	1	L06/05, L06/09, L07/02, L07/11, L07/16, L10/06, L11/04, L12/04, L12/10
M-IVb-071207-071207	8	4	2	1	1	L13/09
M-IIa-241006-241006	8	7	0	1	0	L09/03, L12/12, L13/04
M-IIb-310801-310801	7	6	0	0	1	L11/01, L12/09
M-IIc-301006-301006	6	3	3	0	0	L09/08, L10/02
M-IVb-220803-200792	5	2	2	0	1	
M-IIa-260606-260606	5	3	2	0	0	
M-IIa-201107-201107	4	3	1	0	0	
M-IIa-080507-020507	3	1	2	0	0	
M-IIa-190704-270904	3	2	1	0	0	
M-IIb-231006-310801	3	2	1	0	0	
M-IVb-151005-220607	3	2	1	0	0	
M-IIa-210507-090209bis	3	2	0	1	0	

*S : septicémie ; N : infection du système nerveux central ; A : Autres ; MN : materno-néonatales

Les lignes correspondant aux profils endémiques sont grisées

Tableau 12. Distribution par profils Ascl et Apal et groupe PCR des dépassements de seuil de 2006 à 2013

Profils Ascl/Apal	Groupe PCR	Nombre de dépassements de seuil par année								Dépassements de seuil (N)
		2006**	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	
210792/210792	IVb	1	2	2	1	3	2	2	2	15
200792/200792*	IVb	1	4	3	1	2	1	1	0	13
011001/160602	IVb	1	1	1	3	0	1	1	2	10
151005/151005	IVb	1	1	1	2	2	2	1	0	10
270801/050506	IVb	2	3	0	0	1	1	2	0	9
010901/020701	Ila	2	2	0	1	0	0	0	3	8
151005/111206	IVb	0	0	1	1	2	0	1	0	5
241006/241006	Ila	0	0	0	1	0	0	1	1	3
180110/190110	IVb	0	0	0	0	1	0	2	0	3
050207/050207	Ila	0	0	0	0	0	0	1	1	2
310801/310801	Ilb	0	0	0	0	0	1	1	0	2
301006/301006	Ilc	0	0	0	1	1	0	0	0	2
220803/200792	IVb	0	1	1	0	0	0	0	0	2
271106/271106	Ila	1	0	0	0	0	0	0	0	1
020511/020511	IVb	0	0	0	0	0	1	0	0	1
230908/180110bis	Ila	0	0	0	0	1	0	0	0	1
090507/180407	Ilb	0	1	0	0	0	0	0	0	1
210792/201104	IVb	1	0	0	0	0	0	0	0	1
160907/160907	IVb	1	0	0	0	0	0	0	0	1
200792/170407	IVb	0	1	0	0	0	0	0	0	1
071207/071207	IVb	0	0	0	0	0	0	0	1	1
141107/200792	IVb	0	0	0	0	0	0	0	1	1
Total		11	16	9	11	13	9	13	11	93

* 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

Tableau 13. Fréquence et nombre de pulsotypes Ascl/Apal de 2008 à 2013 en France métropolitaine

	2008	2009	2010	2011	2012	2013
Pulsotype déjà connu identifié 1 fois	96	96	84	94	65	101
Pulsotype identifié 2 à 5 fois	26	24	33	31	22	39
Pulsotype identifié 6 à 12 fois	7	5	3	4	13	9
Pulsotype identifié > 12 fois	2	6	5	4	5	4
Nouveaux pulsotypes identifiés*	57	44	28	25	25	16
Total des pulsotypes Ascl/Apal	268	319	298	277	338	363

* nouveau pulsotype Ascl et/ou Apal

Emergence de profils endémiques (n>12 cas/an)

L'analyse des profils des souches humaines depuis 2006 identifie les trois profils endémiques (n>12 cas/an) reconnus dans la surveillance nationale depuis 2012: M-IVb-210792-210792, M-IVb-200792-200792 et M-IVb-151005-151005. Un quatrième profil pourrait être candidat à être classé parmi les profils endémiques (M-IVb-011001-160602), mais il n'a pas atteint le seuil nécessaire des 12 cas en 2006, 2010 et 2012 (Tableau 14). Ce dernier profil a fait l'objet d'une Urgent Inquiry en 2013 par l'ECDC ayant nécessité un rapport rédigé avec l'InVS sur la fréquence de ce dernier parmi les souches françaises de *Lm*.

Tableau 14. Distribution par année des profils endémiques pour les souches humaines de 2006 à 2013 (NB : les profils similaires et identiques sont présentés ensemble)

	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013
M-IVb-011001-160602	9	16	12	18	10	15	11	18
M-IVb-151005-151005	20	18	10	16	22	20	21	18
M-IVb-200792-200792	25	20	18	24	14	18	22	24
M-IVb-210792-210792	19	23	25	22	26	23	29	47

2.4. CARACTERISATION DES SOUCHES D'ORIGINE NON HUMAINE REÇUES AU CNRL

Analyse générale

Cette activité consiste à caractériser les souches isolées d'aliments ou de l'environnement agro-alimentaire envoyées au CNRL pour :

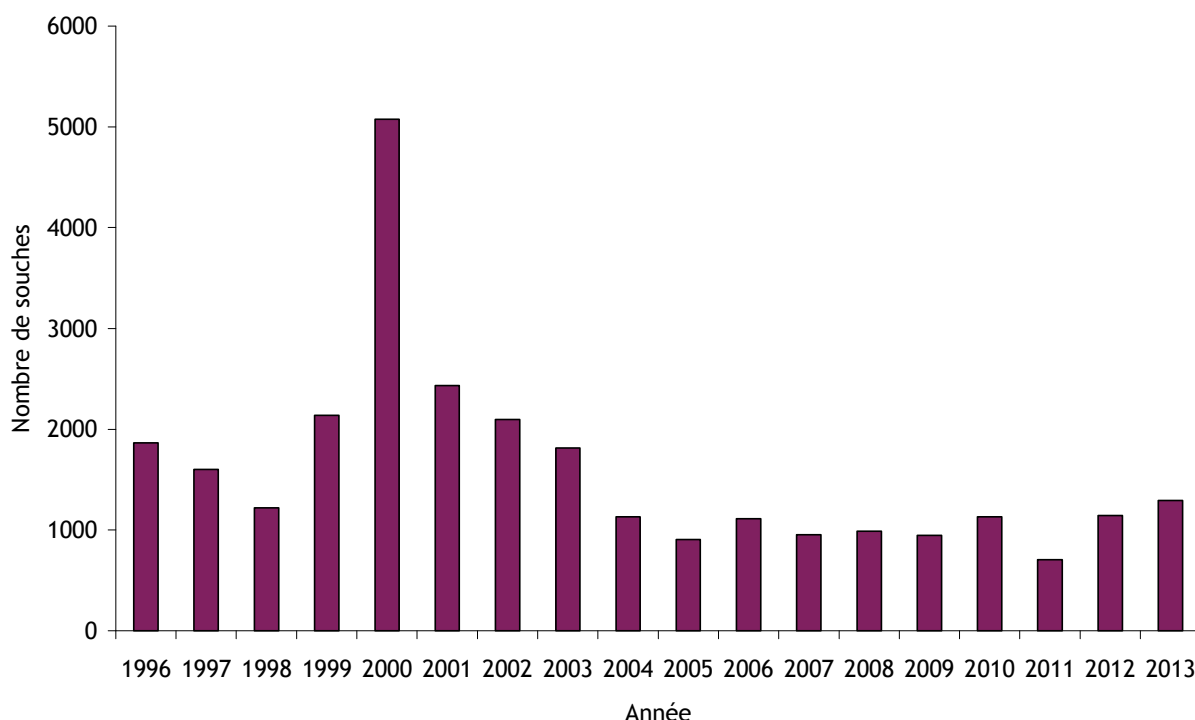
- participer à l'identification du véhicule alimentaire en cas de dépassement de seuil ou en début d'épidémie,
- comparer les souches cliniques aux souches alimentaires et identifier leurs caractéristiques respectives,
- constituer une banque de données pour mener les investigations en cas de dépassement de seuil ou en début d'épidémie.

En 2013, 1292 souches d'origine non humaine ont été adressées au CNRL par des laboratoires français soit une augmentation de 13% par rapport à 2012 (Figure 20). L'envoi des souches d'autocontrôles alimentaires est volontaire, et ce nombre de souches ne représente qu'une faible partie (non estimée) des souches isolées des laboratoires d'analyses agro-alimentaires en France.

95% (2012 :96%) des souches correspondaient à l'espèce *L. monocytogenes*, seule espèce mentionnée dans les réglementations de sécurité sanitaire des aliments et de l'environnement comme critère microbiologique de sécurité. En raison du développement du critère *Listeria* spp. retenu pour la maîtrise de l'environnement des ateliers de production, des laboratoires envoient les autres espèces pour confirmation à la demande de leurs clients (4).

20% des souches reçues étaient contaminées et nécessitaient un ré-isolément (non-respect de l'étape de purification imposée pour la microbiologie alimentaire dans les normes EN ISO 11290), allongeant le délai d'analyse et pouvant entraîner un retard en cas d'investigation autour d'un cas humain ou d'un cas groupé.

Figure 20. Nombre annuel de souches d'origine non humaine adressées par des laboratoires français depuis 1996



La répartition des souches de 2013 suivant la catégorie de laboratoires était la suivante :

- Laboratoires Vétérinaires Départementaux (LVD) : 468 souches (37%) [2012 : 387]
- Laboratoires privés d'hygiène alimentaire : 780 souches (60%) [2012 : 689]
- Laboratoires Interrégionaux de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes : 13 souches (1%) [2012 : 17]
- Laboratoires ANSES - LNRI : 13 souches (1%) [2012 : 45]
- Laboratoire d'Hygiène de Centres Hospitaliers : 17 souches (1%) [2012 : 5]
- Laboratoire de recherche : 1 souche (<1%) [2012 : 0]

L'origine des souches était la suivante :

- Souches isolées d'aliments : 1034 souches (80%) [2012 : 941]
- Souches isolées de l'environnement : 246 souches (19%) [2012 : 182]
- Souches de recherche/sans information : 12 souches (1%) [2012 : 18]
- Souches isolées chez l'animal : 0 souche (0%) [2012 : 1]

Les proportions respectives des origines des souches sont stables depuis 2006. Une fraction des souches alimentaires et de l'environnement, 9% (2012 : 17%), sont réceptionnées de laboratoires d'analyses privés pour caractérisation et isolées dans le cadre d'autocontrôles. Cette expertise est alors facturée au laboratoire demandeur, mais conformément à l'application de l'article R201-11 du Code Rural et de la Pêche Maritime, en cas de problème de santé publique pouvant être relié à ces souches, le CNRL, après information de son client, communiquera les informations aux autorités compétentes et intégrera ces souches dans la surveillance nationale.

Souches isolées d'aliments

Catégories de laboratoire ayant adressé les souches

La provenance des 1034 souches isolées d'aliments en 2013 (2012 : 941 souches) selon la catégorie de laboratoires, était la suivante :

- Laboratoires Vétérinaires Départementaux (LVD): 340 (33%) [2012 : 281]
- Laboratoires privés d'hygiène alimentaire: 653 (64%) [2012 : 608]
- Laboratoires Interrégionaux de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes: 13 (1%) [2012 : 17]
- Laboratoires ANSES-LNRL : 13 (1%) [2012 : 33]
- Laboratoires d'hygiène de Centres Hospitaliers : 15 (1%) [2012 : 2]

En 2013, le nombre de souches isolées d'aliments reçues au CNRL a augmenté de 10% par rapport à 2012. La répartition entre les différentes catégories de laboratoires envoyant des souches au CNRL sont équivalentes à celle de 2012, sauf les envois des laboratoires interrégionaux DGCCRF qui sont en diminution et les envois des centres hospitaliers avec l'investigation d'une infection nosocomiale impliquant la contamination de la cuisine et donc des aliments produits en augmentation. Aucune souche provenant d'échantillons de plan de surveillance ou de contrôle dépassant les seuils réglementaires de 2013 n'a été constatée et donc communiquée au CNRL par le LNRL.

Nombre de souches et distribution par espèce

1017 (98%) (99% en 2012) des 1034 souches ont été identifiées comme *Lm*. Les analyses sur 17 souches (2011 : 8) n'ont pas été effectuées, car il ne s'agissait pas de souches de *Listeria* ou la souche était non viable.

En 2013, une souche de *Bacillus circulans* isolée de végétaux présentait des colonies caractéristiques de *Listeria* spp. sur le milieu Agar selon Ottaviani et Agosti et un code API *Listeria* de *Listeria* spp. proche de *L. weihenstephanensis*. Cette souche sera déposée à la collection de l'Institut Pasteur pour son utilisation dans les études d'exclusivité (sélectivité) des méthodes de microbiologie de la chaîne alimentaire concernant *Lm*.

La répartition par espèce des 1017 souches de *Listeria* était la suivante :

- *L. monocytogenes* : 998 souches (98%) [2012 : 908]
- *L. innocua* : 8 souches (<1%) [2012 : 7]
- *L. welshimeri* : 10 souches (1%) [2012 : 5]
- *L. seeligeri* : 1 souches (<1%) [2012 : 1]

Plus de 98% (97% en 2012) des souches envoyées sont correctement identifiées, ce qui découle possiblement en partie de l'efficacité des géloses chromogènes pour l'isolement de *Lm*.

Distribution des souches de *L. monocytogenes* par catégorie d'aliments

L'origine des 998 souches de *L. monocytogenes* selon la catégorie d'aliment, était la suivante:

- Viande et produits carnés : 367 souches (37%) [2012 : 438]
- Lait et produits laitiers : 393 souches (39%) [2012 : 269]
- Produits de la pêche : 67 souches (7%) [2012 : 52]
- Végétaux : 5 souches (<1%) [2012 : 7]
- Autres aliments : 163 souches (16%) [2012 : 141]
- Sans information (confidentiel) : 3 souches (<1%) [2012 : 1]

Les autres aliments sont des 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 d'information.

En 2013, la distribution des souches est proche de celles de 2012, avec une diminution de la proportion des souches isolées de viandes et produits carnés compensée par une augmentation des souches isolées de produits laitiers.

En 2013 a été décrit une résistance des souches alimentaires et environnementales aux ammoniums quaternaires, comme le chlorure de benzalkonium, qui est très utilisé en industries agro alimentaires pour les nettoyages des ateliers et équipements. Cette résistance peut être détectée au moyen d'une PCR spécifique du Transposon Tn6188, car elle pourrait devenir problématique pour les plans de maîtrise des Industriels agro-alimentaires et la maîtrise du danger *Lm* (42).

Distribution des souches alimentaires de *Lm* par groupe PCR

La répartition des souches par groupe PCR et par catégorie d'aliments est présentée dans le Tableau 15. Le groupe majoritaire est le groupe PCR IIa (sérovarys 1/2a, 3a) comme depuis 2006 (autour de 60%), il représente 70% des souches en 2013. Il faut cependant noter l'augmentation du Groupe PCR IIa (+13% de 2012 à 2013) majoritaire pour les souches alimentaires.

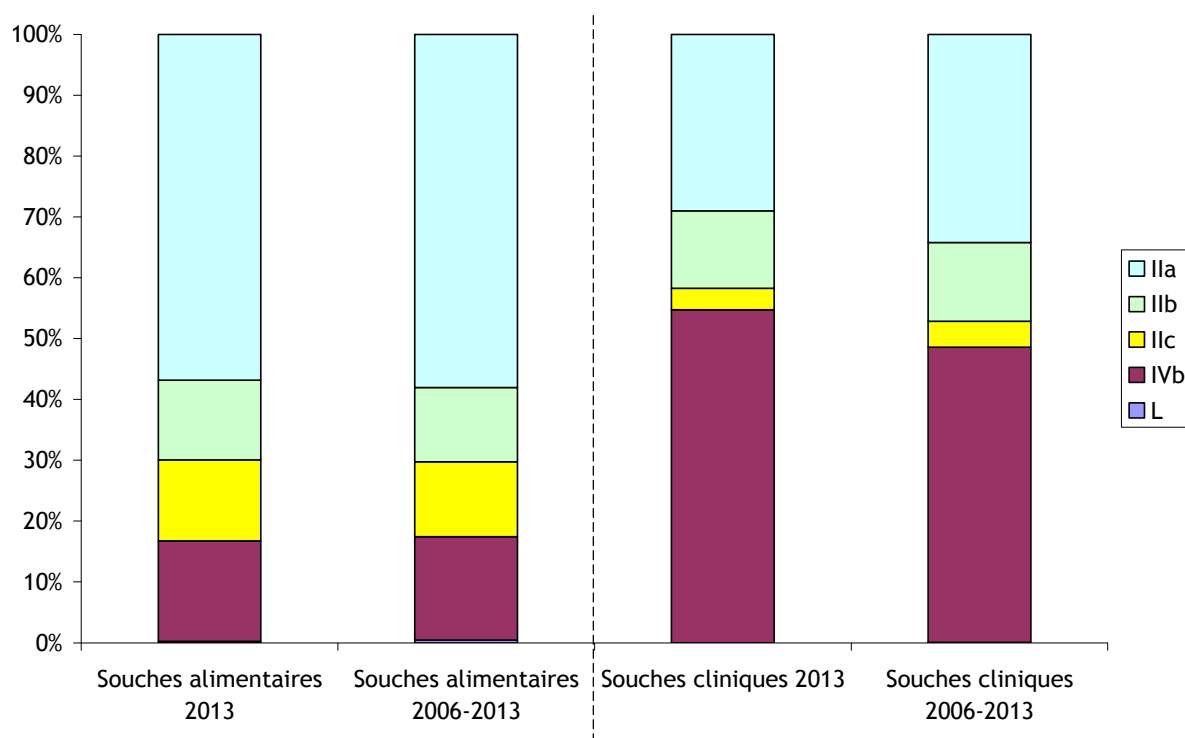
Parmi les souches du groupe PCR L, une souche provenant de fromage a été sérotypée 4a qui est un sérotype très rare, réputé non pathogène et être une évolution entre les sérotypes 1/2a et 4b (8, 39).

Tableau 15. Distribution par groupe PCR par catégorie d'aliments des 998 souches de *L. monocytogenes* reçues en 2013 de laboratoires français comparée à la distribution par groupe PCR des souches humaines françaises

Groupe PCR	viande et produits carnés	lait et produits laitiers	produits de la pêche	végétaux	autres aliments	origine non précisée	Total	Souches humaines
IIa	224	304	56	3	111	1	699 (70%)	135 (37%)
IIb	26	22	10	2	22	0	82 (8%)	32 (9%)
IIc	64	1	1	0	9	1	76 (7%)	12 (3%)
IVb	52	65	0	0	21	1	139 (14%)	184 (51%)
L	1	1	0	0	0	0	2 (<1%)	0 (0%)
Total	367	393	67	5	163	3	998	363

Comme l'illustre la Figure 21 et le Tableau 15, le groupe PCR IVb (sérovarys 4b, 4d et 4e) ne représente que 14% des souches isolées d'aliments, alors qu'il est le groupe le plus fréquemment impliqué en pathologie humaine, ce qui suggère une virulence accrue des souches du groupe PCR IVb (12, 14, 33, 37, 38). Le groupe IIc semble être associé à la viande et autres produits carnés, et il n'est que rarement à l'origine de cas humains. Les souches du groupe PCR IVb expriment une InIA fonctionnelle (facteur de virulence permettant la traversée des barrières intestinale et placentaire) (14, 33, 38), alors que les souches du groupe PCR IIc expriment une InIA très majoritairement tronquée et non fonctionnelle. Ceci peut, en partie, expliquer leurs fréquences différentes dans les souches d'origine alimentaires vs. cliniques (33).

Figure 21. Distribution des groupes PCR des souches de *L. monocytogenes* cliniques et alimentaires en 2013 et de 2006 à 2013



Distribution des souches alimentaires de *Lm* par pulsotype

Comme présenté dans le Tableau 16, la comparaison entre les souches d'origine alimentaire et clinique illustre que :

- Certains principaux profils ($n > 5$ souches alimentaires avec ce profil dans l'année) dans les souches alimentaires ne sont pas retrouvés dans les principaux profils des souches cliniques ($n > 3$ cas humains avec ce profil dans l'année): il pourrait s'agir de souches relativement moins virulentes, mais également des candidats aux dépassements de seuil futurs à surveiller. A l'inverse, l'un des principaux profils des souches cliniques (M-IVb-200792-200792) n'est pas un profil principal dans les souches alimentaires.

- Certains des principaux profils de souches alimentaires sont aussi des principaux profils de souches cliniques, certains impliqués dans des dépassements de seuil.

Les profils M-IIc-301006-301006, représentant 63% des souches du Groupe PCR IIc, et le profil M-IIa-241006-241006 sont prédominants en alimentaire et dans les échantillons d'environnement (décrits ci-après) alors qu'il n'existe presque pas de cas humains en 2013 avec ces profils (Cf. S. Roussel, Poster, ISOPOL, 2013).

Tableau 16 Pulsotypes les plus fréquemment rencontrés (>5) en 2013 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 2013 avec ce profil
M-IIa-241006-241006	98	X	2
M-IIa-050207-050207bis	52	X	1
M-IIa-271006-050207	49		
M-IIc-301006-301006	48	X	
M-IIa-010901-020701*	43	X	3
M-IIa-230905-230905	39		
M-IIa-010901bis-020701bis*	31	X	3
M-IIa-260606bis-260606bis	30	X	
M-IVb-151005-151005	30	X	
M-IIa-100608-230905	27		
M-IIb-310801-310801	22	X	
M-IVb-210792-210792	20	X	
M-IVb-140907-070907	14		
M-IIa-050508bis-050508	12		
M-IIb-090507-180407	12		
M-IIa-150708-160907bis	11		
M-IIa-270707-270707	11		
M-IVb-011001-160602	11	X	2
M-IVb-241007-050506	10		
M-IIa-260606-260606	9	X	
M-IIa-230705-190308	8		
M-IVb-071207-071207	8	X	1
M-IIa-230908-031213	7		
M-IIa-241006-111013	7		
M-IIa-241006-230905bis	7		
M-IIa-290507-290507	7		
M-IIa-140611-270707	6		
M-IIa-271106-271106	6		
M-IIa-280104-260607	6		

* *profils similaires*

L'évaluation des fréquences relatives des profils des souches alimentaires et humaines lors de la surveillance microbiologique hebdomadaire de la listériose par le CNRL est importante. 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. Une alerte-produit avec des souches alimentaires de profil rare associées à des souches humaines avec des profils similaires entraîne une investigation des cas humains par l'InVS au moyen du questionnaire alimentaire et des investigations auprès du patient. En outre, l'information de rareté ou d'absence au sein de la base des souches alimentaires du CNRL d'un pulsotype donné associé à des cas cliniques peut conduire à requérir des informations auprès des autres pays européens par le biais de la plateforme EPIS de l'ECDC.

Souches isolées de l'environnement

En 2013, 246 souches (2012 :182 souches, soit +35%) provenant de l'environnement ont été reçues au CNRL, adressées par les laboratoires vétérinaires départementaux (n=127), des laboratoires privés (n=118) et d'un centre hospitalier (n=1 ; cuisine centrale), suite aux analyses en conformité à l'article 5 du règlement européen EC 2073/2005 modifié sur les prélèvements de surface en agro-alimentaire et au 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>). Ces souches se répartissaient en 2013 souches de *L. monocytogenes*, 6 souches de *L. innocua*, 25 souches non *Listeria* et une souche de *L. welshimeri*.

La répartition par groupe PCR des 213 souches de *L. monocytogenes* est la suivante :

- groupe PCR IIa (sérovars 1/2a et 3a): 140 souches (66%) (2012 : 108)
- groupe PCR IIb (sérovars 1/2b, 3b et 7): 25 souches (12%) (2012 : 24)
- groupe PCR IIc (sérovars 1/2c et 3c): 15 souches (7%) (2012 : 24)
- groupe PCR IVb (sérovars 4b, 4d et 4e): 32 souches (15%) (2012 : 20)
- groupe PCR L (autres sérovars, mais sérotypée 1/2a): 1 souche (<1%) (2012 : 0)

Comme pour les souches isolées d'aliments, les souches des groupes PCR IIa, IIb et IIc sont majoritaires, et représentent 85 % des souches de *L. monocytogenes* isolées de l'environnement.

Les profils de macrorestriction d'ADN majeurs associés aux souches de l'environnement (fréquence >5) sont différents de ceux identifiés en 2012 sont par ordre décroissant : M-IIa-010901/020701, M-IIa-230905/230905, M-IVb-210792-210792, M-IIa-241006/241006 ; M-IIc-301006/301006; M-IVb-071207-071207. Les profils M-IIb-310801bis-310801 et M-IVb-270801-050506bis rencontrés en 2012 ne l'ont pas été en 2013. On retrouve ceux des souches alimentaires majoritaires. Ces 6 derniers profils font partie de ceux des souches cliniques majoritaires, à l'exception du profil M-IIa-230905/230905.

Ces données ne sont pas nécessairement significatives vu le relativement faible nombre de souches d'origine environnementale reçu au CNRL. De plus, la majorité des souches de l'environnement sont d'origines agro-alimentaires ou issues 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.

2.5. 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.

Suspensions d'infections nosocomiales

À 15 reprises en 2013 (contre 21 en 2012 et 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.

Le CNRL a transmis à la cellule *Listeria* en février 2014 les demandes des hygiénistes d'établissements de soins demandant des recommandations pour la maîtrise du danger *Lm* pour l'alimentation dans les établissements de soins: critères microbiologiques à appliquer par rapport aux populations à risque et la gestion des alertes-produits.

Demande des ARS

L'ARS de Picardie a sollicité le CNRL pour la comparaison de 4 souches humaines, l'étude microbiologique de ces souches a mis en évidence qu'elles n'étaient pas similaires.

Dépassements de seuils

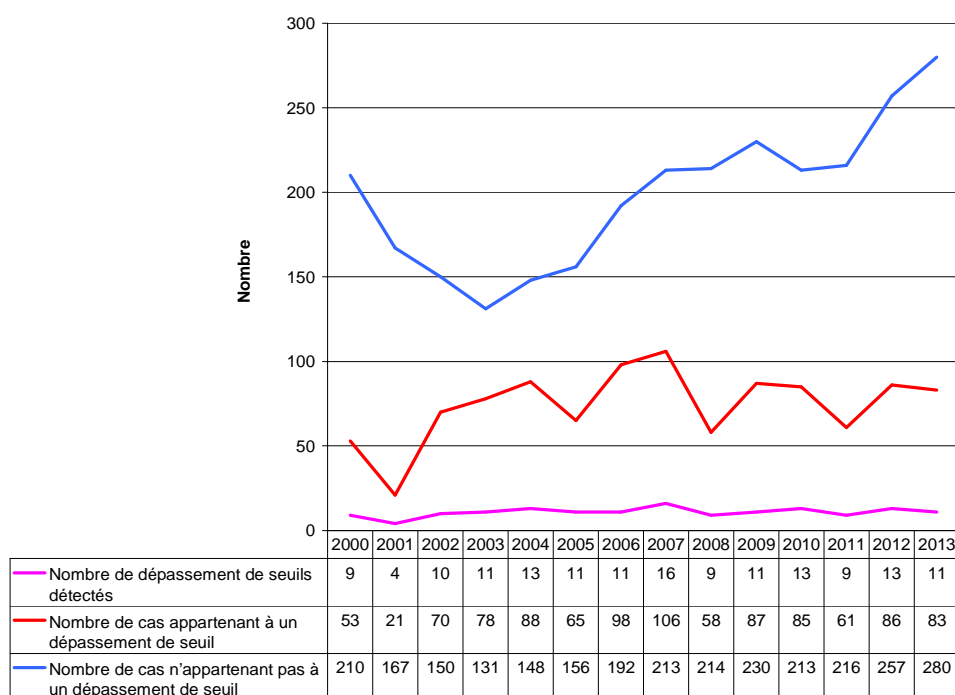
En 2013, le CNRL a notifié 11 dépassements de seuil (2012: 13) (Tableaux 17 et 18, Figure 22). Cette valeur est stable par rapport aux années précédentes : 9 à 16 par an entre 2006 et 2012. Cependant il faut noter que le système a changé en 2012 avec l'identification des profils endémiques et la mise en œuvre de mesures de surveillance spécifiques.

Tableau 17. Synthèse des dépassements de seuils effectués par le CNRL en 2013. En jaune, les pulsotypes endémiques

Dépassement de seuil	Nombre de cas	Date du dépassement de seuil	Date de cloture	Caractéristiques des souches		
				Groupe PCR	Profil Ascl	Profil Apal
L12/13	26	01/10/2012	11/02/2013	IVb	210792	210792
L13/01	4	08/04/2013	06/05/2013	IIa	010901	020701
L13/02	3	08/04/2013	21/05/2013	IVb	011001	160602
L13/03	6	15/04/2013	21/05/2013	IVb	210792	210792
L13/04	4	01/07/2013	05/08/2013	IIa	241006	241006
L13/05	9	15/07/2013	16/09/2013	IIa	010901	020701
L13/06	9	26/08/2013	18/11/2013	IVb	011001	160602
L13/07	6	26/08/2013	08/11/2013	IVb	141107	200792
L13/08*	34	17/09/2013	En cours	IVb	210792	210792
L13/09*		01/10/2013	En cours	IVb	071207	071207
L13/10	5	28/10/2013	02/12/2013	IIa	010901	020701
L13/11	3	13/01/2013	13/01/2014	IIa	050207	050207bis

* fusionné lors de l'investigation

Tableau 18. Dépassements de seuil de listériose, cas associés à des dépassements de seuil et cas sporadiques, France, 2000-2013 (modifié de Goulet et coll., 2008 (21, 23))



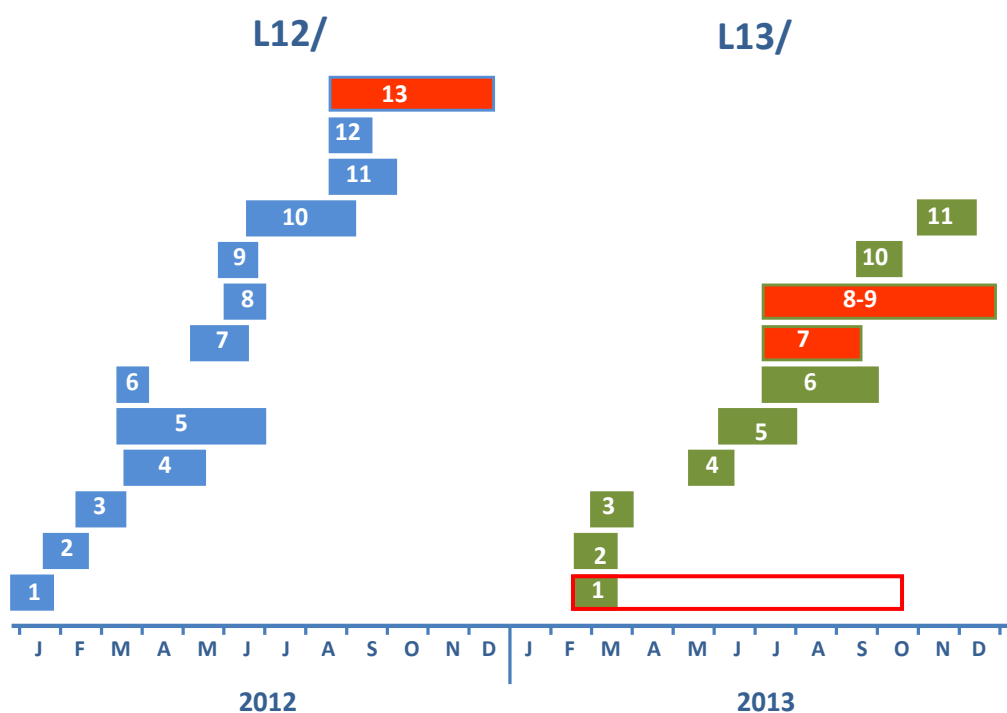
315 souches (2012 : 244) étaient concernées, se décomposant de la façon suivante : 88 souches humaines (correspondant à 83 cas humains), 177 souches alimentaires et 50 souches d'environnements agro-alimentaires. 202 (65%) souches alimentaires et environnementales provenaient des souches d'alertes-produits DGAL.

Les souches humaines reliées à un dépassement de seuil représentent ainsi 23 % du total des souches humaines reçues au CNRL en 2013. Les formes cliniques de ces cas associés à un dépassement de seuil sont : N (27%), S (47%), A (6%) et MN (21%).

Les souches impliquées appartenaient majoritairement au groupe PCR IVb (70%), puis au groupe PCR IIa (30%) (Tableau 20). Les deux profils majoritaires en 2013 furent le profil endémique M-IVb-210792/210792 et le profil fréquent M-IIa-010901-020701. Ce dernier profil a été associé en 2009 à un dépassement de seuil. La prépondérance du profil M-IIa-241006-241006 pour les souches alimentaires s'est traduite par un dépassement de seuil L13/04 comme en 2012.

Figure 22. Répartition temporelle des dépassements de seuil en 2012 et 2013

(Les encadrés verts indiquent les dépassements de seuil en 2013, les encadrés bleus indiquent les dépassements de seuil en 2012 ; les rectangles rouge sont les dépassements de seuil secondairement qualifiés d'épidémies par la cellule *Listeria* ; l'encadré rouge correspond à l'investigation autour d'une transmission nosocomiale faisant suite à un dépassement de seuil en 2013). (Modifié de M. Tourdjman, InVS)



En 2013, 3 dépassements de seuils ont été reliés épidémiologiquement, avec confirmation microbiologique, à des aliments.

Toxi-Infection Alimentaire Collective et Epidémies

Une toxi-infection alimentaire collective touchant 4 personnes d'une famille a été investiguée en 2013 liée à la consommation de fromage de brebis contaminé à $8,5 \cdot 10^6$ CFU/g fabriqué et commercialisé en Corse.

Deux épidémies ont été observées en 2013 concernant respectivement :

- du fromage de brebis contaminé à moins de 10 CFU/g et vendu sur un marché avec 3 cas humains reliés (Dépassement de seuil L13/07) et
- des quenelles (contaminés à plus de 1 500 UFC/g avec 10 cas humains reliés au dépassement de seuil L13/08&09).

Dans la mesure où ses fromages ont été commercialisés sur internet et potentiellement consommés par des touristes étrangers pour la première épidémie et dans le cadre de la recherche de l'aliment contaminé pour la deuxième épidémie, la plateforme ECDC EPIS a été utilisée.

Alertes-produits DGAL

En 2013, 947 souches (753 en 2012, 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 314 alertes produits DGAL et DDPP (268 en 2012, 282 en 2011, 314 en 2010, 332 en 2009, 280 en 2008, 198 en 2007, 200 en 2006). Ces souches se répartissaient en 801 souches alimentaires et 146 souches d'environnements agro-alimentaires. Le nombre de souches par alerte produit variait de 1 à 40 souches.

En 2013, 314 alertes-produits ont été répertoriées par la DGAL en :

- 283 alertes suite à un autocontrôle dont 5 alertes RASFF;
- 18 alertes suite à un contrôle officiel dont 5 alertes RASFF;
- 2 alertes suite à un contrôle aux frontières;
- 6 alertes suite au plan de contrôle et de surveillance DGCCRF ;
- 4 alertes suite à une investigation autour d'un cas humain ;
- 1 autre alerte non précisées.

Les alertes RASFF concernaient principalement du saumon et du fromage.

Le taux d'exhaustivité de récupération des souches d'alertes déterminé est de 72% (76% en 2012 et 2011, 81% en 2010, 67% en 2008 et 62% en 2009).

Le non-envoi des souches au CNRL peut s'expliquer par :

- La méconnaissance du système d'alertes-produits
- L'absence de l'obtention de numéro d'alerte par la DDPP locale ;
- Le fait que les alertes produits < 100 UFC/g n'aboutissent pas à un envoi par le laboratoire au CNRL
- Le client peut refuser l'envoi des souches au CNRL ;
- Les souches ne sont pas toujours conservées par le laboratoire ou sont non viables.

Comme en 2013, 100% des souches de *Lm* issues d'aliments analysés spécifiquement pour *L. monocytogenes* dans le cadre des alertes-produits ont été confirmées comme *L. monocytogenes* (2012 : 100%).

La répartition par groupe PCR des 947 souches de *Lm* issues d'aliments et d'échantillons de l'environnement analysés spécifiquement pour *Lm* dans le cadre des alertes-produits était la suivante:

- Groupe PCR IIa (sérovars 1/2a et 3a) : 634 souches (67% contre 65% en 2012),
- Groupe PCR IIb (sérovars 1/2b, 3b et 7) : 86 souches (9% contre 13% en 2012),
- Groupe PCR IIc (sérovars 1/2c et 3c) : 68 souches (7% contre 8% en 2012),
- Groupe PCR IVb (sérovars 4b, 4d et 4e) : 156 souches (16% contre 14% en 2012),
- Groupe PCR L (sérovars 4a, 4ab, 4c) : 3 souches (<1% contre <1% en 2012)

Les profils *Ascl/Apal* de *L. monocytogenes* majoritairement retrouvés (>16 en 2012) dans les alertes produits sont par ordre décroissant M-IIa-241006-241006, M-IIa-230905-230905, M-IIc-301006-301006, M-IIa-050207-050207bis, M-IIa-271006-050207, M-IIa-010901-020701, M-IIa-260606bis-260606bis, M-IVb-151005-151005, M-IVb-210792-210792, M-IIa-100608-230905, M-IIb-310801-310801. Les 3 profils majoritaires sont identiques à ceux de 2012.

Les dénombrements en *Listeria monocytogenes* variaient de 10 à 8,5 10⁶ UFC/g. Comme depuis 2007, les produits de charcuterie sont parmi les aliments les plus contaminés.

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 2013 pour *Listeria* et lors d'inspections. En 2013, le CNRL a reçu directement 13 souches d'alertes-produits de la DGCCRF, mais aucune souche du LNRL issue des souches des plans de contrôle ou de surveillance avec dépassements de seuil pour l'échantillon étudié.

Enquêtes des formes neuroméningées

En 2013, 97% (92/95 [2012 : 97/104]) des listérioses neuroméningées ont bénéficié de ce type d'enquête contre 93% en 2012. Ce chiffre est en augmentation régulière depuis 2006 : 56% en 2006, 62% en 2007, 77% en 2009, 82% en 2010 96% en 2011, 93% en 2012. Selon les rapports communiqués par la DGAL, 24 investigations (26% ; contre 40% en 2012) n'ont pas été suivies d'enquêtes localement donnant lieu à des prélèvements dans le réfrigérateur du patient ou de sa famille.

En 2013, parmi les 9 cas (10%, le plus bas taux depuis 2003(45)) où des souches alimentaires ou de l'environnement du réfrigérateur ont été isolées ; à 6 reprises (67% ; 2012 : 60%), leurs caractéristiques microbiologiques étaient similaires à celles du patient. Ces aliments concernaient des fromages, des végétaux cuisinés et dans un cas du saumon fumé.

Ainsi, les prélèvements à domicile proposés à tous les cas de listériose neuroméningée sont un complément utile à la DO et permettent dans certains cas d'identifier rapidement la source de contamination. Ces investigations permettent en outre de maintenir localement l'expertise nécessaire à des investigations rapides en cas de cas groupés ou d'épidémies dont les investigations nécessitent des prélèvements dans les réfrigérateurs ou les lieux d'achats des familles.

3. ACTIVITES D'INFORMATION, DE FORMATION ET DE CONSEIL

Le CNRL a également pour mission la mise à jour et la diffusion des connaissances dans le domaine de *Listeria* et de la listériose

- auprès du grand public ;
- auprès des professionnels de santé et du secteur agro-alimentaire afin de les renseigner et les sensibiliser au danger représenté par *L. monocytogenes*.

3.1. CENTRE DE DOCUMENTATION

Le CNRL/CCOMS des *Listeria* dispose d'une collection d'articles papier de 1956 à 2000 sur *Listeria* et un accès aux bases de données en ligne pour les articles de 2000 à nos jours, ainsi qu'une collection d'ouvrages de référence et de données historiques. Les chercheurs ou étudiants qui en font la demande peuvent consulter ce centre de documentation.

3.2. SITE INTERNET

Le CNRL/CCOMS des *Listeria* dispose d'un site internet en français et en anglais (<http://www.pasteur.fr/cnr/listeria>). Ce site permet d'accéder aux différentes feuilles de recueil d'informations devant accompagner l'envoi de souches, à des liens utiles, aux conditions générales analytiques du CNRL, aux missions du CNRL, aux rapports d'activité du CNRL, et une rubrique de réponses aux questions fréquemment posées au CNRL (FAQ). En 2013, il a été consulté 813 fois pendant une durée moyenne de 1,5 minute.

3.3. VEILLE INTERNET

Le CNRL/CCOMS des *Listeria* est abonné à plusieurs réseaux d'alertes tant en santé humaine qu'en sécurité alimentaire et effectue des filtres de notification via internet afin d'informer par email ses partenaires de la cellule *Listeria* en cas d'épidémies ou d'alertes-produits pouvant toucher la France ou de phénomènes anormaux rapportés sur le web.

3.4. ENSEIGNEMENTS, FORMATIONS, ACCUEIL DE STAGIAIRES

En 2013, le CNRL a participé à des formations continues de médecins, biologistes, personnels soignants, chefs de laboratoires, techniciens, responsable qualité du secteur agro-alimentaire et hygiénistes des hôpitaux :

- Institut Pasteur, Cours de Bactériologie médicale : *Listeria*, Paris, 06/05/13, A. Leclercq.
- ADRIA Développement de Quimper, formation continue « Pathogènes alimentaires » : *Listeria monocytogenes*, Rennes, 25/09/13, A. Leclercq
- DES obstétrique, cours *Listériose*, le 16/05/13, C. Charlier
- Séminaire pour le Staff du SMIT Tenon, Maladies infectieuses et médecine tropicale, Groupe Hospitalier Est Parisien, AP-HP, Paris. Neurolistériose, M. Lecuit
- Séminaire pour le staff de Pédiatrie Générale, Hôpital Necker Enfants Malades, AP-HP, Paris, Mars 2013. Actualités sur la listériose, C. Charlier
- Séminaire pour le staff de Maladies Infectieuses, Hôpital Saint Louis, AP-HP, Paris, Mars 2013. Listériose en 2013, C. Charlier

En 2013, le CNRL a accueilli Mme Leila Bouayad, inspectrice vétérinaire en Algérie, pour un stage dont l'objectif était « Identification et caractérisation de *L. monocytogenes* isolées de viandes de volailles en Algérie » (Doctorat option hygiène et sécurité des aliments de l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger, Algérie) pour un transfert de techniques et étude de souches.

3.5. PARTICIPATION A LA REDACTION DE COMMUNICATION ECRITES DIDACTIQUES

Le CNRL a participé à l'élaboration des chapitres suivants:

- Lecuit, M., and C. Charlier. **Listériose**. Chapitre 67. Pilly Edition 2014.
- Charlier, C., and M. Lecuit. **Fiches e-POPI *Micrococcus*, *Listeria*, *Fusarium*, *Geotrichum* et *Malassezia***.
- Leclercq, A., A. Oevermann, R. Danguy-des-Déserts, Sophie Granier, Thomas Hammack, Karen Jinneman, Yi Chen, Robert Rathbone, Garlon Riegler. ***Listeria monocytogenes***. Chapitre 2.9.7. In OIE Terrestrial Manual. World Organization for Animal Health (OIE), Paris, Submitted to world assembly of delegates of the OIE.

3.6. ACTIVITE DE CONSEIL

Le CNRL a reçu en 2013 390 demandes d'information par e-mail (listeria@pasteur.fr) (-8/semaine) et 350 appels téléphoniques (-7/semaine). Il s'agit de l'application du point 4.7 Prestations de conseils de la norme EN ISO 15189 et le point 4.4. Revue de contrat de la norme EN ISO 17025.

Professionnels de santé

- demandes de renseignements concernant l'envoi de souche
- demandes de conseils microbiologiques (prélèvements biologiques à réaliser, isolement, identification, typage des souches, et/ou interprétation des résultats)
- demandes d'aide au diagnostic (stratégie diagnostique, réalisation d'antibiogramme, diagnostic complémentaire par PCR et/ou sérologie)
- demandes de conseils thérapeutiques (ex : alternative thérapeutique en cas d'allergie aux β -lactamines)

Professionnels de l'alimentaire

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

Particuliers

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

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

3.7. EXPERTISES

Expertises de souches

En 2013, le CNRL a reçu 3 souches isolées de patients, adressées par des laboratoires de biologie médicale de pays étrangers pour expertise (Cf. Annexe C).

Le CNRL a également reçu 116 souches d'origine environnementale et/ou alimentaire (195 en 2012), adressées par des laboratoires d'hygiène et de contrôle des aliments pour leur identification et leur caractérisation dans un cadre de prestations privées payantes.

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

En 2013, les responsables du CNRL ont contribué et 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 (ECDC/EFSA) et internationale (Pulsenet) des méthodes de groupage PCR et de typage moléculaire des *L. monocytogenes*.

L'organisme de validation Afnor validation, reconnu par la DGAL pour la validation des méthodes microbiologiques en agro-alimentaires, a demandé au CNRL de définir ce qu'était une collection de souches de *Listeria* spp. représentatives des espèces et des populations pour l'utiliser dans les validations des méthodes.

Expertise de publications et de projets scientifiques

En 2013, le CNRL a participé à la relecture de plus de 20 articles dans des journaux nationaux et internationaux à comités de lecture.

Expertises dans des comités nationaux, européens ou internationaux

Les responsables du CNRL ont participé comme experts ou conseillers dans différentes instances : ECDC groupe *Listeria*, groupe de travail permanent de la Coordination des Laboratoires de Référence et d'Expertise (Institut Pasteur), Réseau de Microbiologistes Médicaux (R2M), Comité Européen de Normalisation en microbiologie de la chaîne alimentaire CEN TC275/WG6, Comité français Afnor V08B, Comité International de normalisation en microbiologie des aliments ISO TC34, Comité d'experts spécialisés CES « Evaluation des risques biologiques des aliments » de l'ANSES.

Conseil auprès de Ministère

De par sa participation à la cellule *Listeria*, le CNRL est en contact avec les services concernés des Ministères de l'Economie, de l'Agriculture et de la Santé. Le CNRL participe à la préparation d'avis de l'ANSES en participant à l'étude de saisine de l'ANSES.

Conseil auprès de l'ECDC, la FAO, l'OMS

Le CNRL participe en relation avec l'InVS et les Ministères concernés aux réponses aux demandes par les systèmes EPIS, RASFF, INFOSAN sur des épidémies ou des cas groupés ou des produits alimentaires contaminés.

3.8. RETOUR D'INFORMATIONS

La surveillance microbiologique de la listériose en France se fonde sur l'envoi volontaire et centralisé au CNRL de souches isolées de patients par les laboratoires médicaux, et sur celui de souches non humaines par les laboratoires d'hygiène et de contrôle des aliments.

Dans chaque cas, un compte-rendu détaillé des analyses effectuées pour chaque souche est envoyé au laboratoire expéditeur. En cas d'atypies sur la souche ou si le cas clinique est atypique, le laboratoire expéditeur est contacté par l'un des responsables pour échanges d'informations ou études complémentaires éventuelles.

L'échange d'informations avec nos correspondants est un élément qui a également pour objectif de favoriser la participation des laboratoires, pivot de la surveillance et de son exhaustivité.

Le CNRL participe à la réunion multidisciplinaire de chimiothérapie infectieuse (RICAI) sur les sujets en rapport avec son activité.

En 2009, le CNRL avait publié un point sur la listériose dans la Revue du praticien (6). En 2011-2012, le CNRL a été corédacteur de la fiche ANSES sur *L. monocytogenes* (www.anses.fr/Documents/MIC-Fi-Listeria.pdf). En 2012, le CNRL avait réalisé une synthèse de la surveillance humaine et alimentaire en France de la listériose qui a été publiée dans un numéro hors série du bulletin épidémiologique hebdomadaire (24, 46). Depuis 2011, le CNR étudie de façon rétrospective les formes rares de listérioses : infections ostéo-articulaires (7), cholécystites, infections endovasculaires (en cours).

Depuis 2007, le rapport d'activité du CNRL est mis en ligne sur notre site web (Adresse <http://www.pasteur.fr/cnr/listeria> rubrique « actualités-Rapports ») et adressé à tous les institutionnels investis dans la surveillance de la listériose ainsi qu'à toute personne en faisant la demande.

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

Le CNR des *Listeria* est affilié à l'Unité de Biologie des Infections (Institut Pasteur). Chaque année, l'Institut Pasteur attribue un budget propre au CNRL et au CCOMS en complément de celui octroyé par l'InVS pour le CNRL. Outre son utilisation pour le financement de personnels, d'équipement et de frais de fonctionnement, ce budget permet de développer des projets de recherche qui sont à l'interface entre les activités de surveillance du CNR et les activités de recherche de l'Unité.

L'activité de recherche du CNR porte sur 3 volets :

- recherche appliquée, qui découle directement de notre activité de référence, et vise à améliorer les aspects techniques et diagnostiques.
- recherche microbiologique, 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*.
- recherche physiopathologique, à l'interface des activités épidémiologiques, cliniques et microbiologiques du CNRL et des activités de recherche de l'Unité.

Les méthodes en développement ou les recherches déjà citées dans l'annexe C ne sont pas décrites dans ce chapitre. Les paragraphes en anglais correspondent soient aux abstracts des publications, soient aux actes de colloques non disponibles sur le web.

4.1. CONTRIBUTIONS AUX ETUDES EPIDEMIOLOGIQUES

Etude de la contamination du beurre et impact en santé publique

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

*En collaboration avec D. Michelon (EURL *L. monocytogenes*), H. Bergis (EURL *L. monocytogenes*) et A. Beaufort (EURL *L. monocytogenes*).*

Article soumis.

Le beurre est identifié depuis 2006 comme une source potentielle nouvelle de contamination. En partenariat avec l'EURL *Lm*, le CNRL a étudié la capacité de croissance de *Lm* dans les beurres français, et démontré la capacité de *Lm* à survivre dans cet aliment qui fut la cause d'une épidémie en Finlande (40).

Etude de la prévalence des *Listeria spp.* en Tunisie au moyen d'une puce à ADN d'identification

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

En collaboration avec F. Hamaïed (Laboratoire de microbiologie et biologie moléculaire, CNSTN, pôle technologique, Sidi Thabet, Tunisie).

Article paru : F. Hamaïed et coll. 2013. Pathol. Biol. 62(1):24-9. (30)

Between 2005 and 2007, one hundred food samples collected in the markets of Tunis were analysed in our study. Five strains of *Listeria monocytogenes* responsible for human listeriosis isolated in hospital of Tunis were included. Multiplex PCR serogrouping and pulsed field gel electrophoresis (PFGE) applying the enzyme *Ascl* and *Apal* were used for the characterization of isolates of *L. monocytogenes*.

We have developed a rapid microarray-based assay to a reliable discrimination of species within the *Listeria* genus. The prevalence of *Listeria* spp. in food samples was estimated at 14% by using classical biochemical identification. Two samples were assigned to *Lm* and 12 to *L. innocua*. DNA microarray allowed unambiguous identification of *Listeria* species. Our results obtained by microarray based assay were in accordance with the biochemical identification. The two food *Lm* isolates were assigned to the PCR serogroup IIa (serovar 1/2a). Whereas human *Lm* isolates were of PCR serogroup IVb, (serovars 4b). These isolates present a high similarity in PFGE. Food *Lm* isolates were classified into two different pulsotypes. These pulsotypes were different from that of the five strains responsible for the human cases. We confirmed the presence of *Listeria* spp. in variety of food samples in Tunisia. Increased food and clinical surveillance must be taken into consideration in Tunisia to identify putative infections sources.

Prévalence des sérotypes de *L. monocytogenes* dans une catégorie de salami italien

Personnes impliquées au CNRL : A. Leclercq, A. Morvan, M. Lecuit
En collaboration avec M. Favretti (Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Venise, Italie).
Poster présenté à ISOPOL (Goa, Inde)

Since 2007 in Veneto and Friuli Venezia Giulia Regions (Eastern Italy), farmers have been allowed to transform and sell small quantities of locally processed swine meat, derived from their own animals. These products were analyzed in different stages along the production chain (minced meat, products during seasoning) with the aim to evaluate the food safety levels that must be at least the same of industrial productions. In particular, we focused the attention on *Lm*, which is the most relevant pathogen observed in fermented meat. In the winter seasons from 2009 until 2012, 1.209 samples were analyzed including fresh meat, sausages, fermented salami and sopresse; 123 products (10%) were contaminated with *Lm* [Range <10⁻⁵×10⁶ cfu/g] and 95% below the European microbiological criteria of 100 CFU/g. Positive samples were monitored during the entire seasoning period and analysed in different moments until the end of the seasoning, a decrease of the amount of *Lm* was observed. In order to obtain information about the structure of this *Lm* population, 81 strains were serotyped by classical agglutination and molecular genoserotyping according to Doumith *et al.* (2004), and subtyped by *Ascl/Apal* PFGE (PulseNetUSA, 2009). Most of the strains belonged to PCR group IVb (4b, 4d and 4e) and IIc (1/2c and 3c); analysis of combined *Ascl* and *Apal* PFGE profiles is in progress on the 13 strains clusters observed to find links with data from farmers or animals. According to contamination of these products by *Lm*, investigation of the source of their contamination, raw materials or/and environment of this food production, shall be performed to control this pathogen.

4.2. ANALYSES CLINIQUES

Infektions biliaries à *Listeria monocytogenes*

Personnes impliquées au CNRL : C. Charlier-Woerther - A. Leclercq - M. Lecuit
Poster présenté à l'European congress of clinical microbiology and infectious diseases (ECCMID) 2013.
Article soumis

Along with the classical forms of infection by *Lm* (septicemia, central nervous system and maternal-neonatal infections), cases of cholecystitis and angiocholitis due to *Lm* have been seldom reported as case reports. Their epidemiological, clinical and microbiological features are poorly known. Retrospective study of 10 biliary tract listeriosis cases reported to the French National Reference Center for *Listeria* from January 1987 to March 2013, and review of 7 additional previously published cases.

Lm-associated biliary tract infection predominantly involves older patients with lithiasis and comorbidity. It is associated with high mortality (20%). Patients with *L. monocytogenes*-associated biliary tract infection require amoxicillin-based therapy and surgical treatment.

Infections endovasculaires à *Listeria monocytogenes*

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

Poster présenté à l'European congress of clinical microbiology and infectious diseases (ECCMID) 2013.

Along with the classical forms of infection by *Lm* (septicemia, central nervous system and maternal-neonatal infections), cases of endovascular infections have been seldom reported since 1955. Their epidemiological, clinical and microbiological features are poorly known.

Retrospective study of 21 endovascular cases reported to the French National Reference Center for *Listeria* from January 1987 to March 2013.

Lm-associated endovascular infection mostly involves older male patients with prosthetic device and co-morbidity. They require intensive treatment based on adequate prolonged antimicrobial therapy. They are still associated with high mortality (38%).

Etude MONALISA : Multicentric Observational National Analysis of LIsteriosis and Listeria

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

Communication orale présentée à ISOPOL 2013(Goa, Inde) par C. Charlier-Woerther: MONALISA: Multicentric observational national analysis on listeriosis and Listeria.

Les données disponibles sur la présentation clinique, biologique, les facteurs pronostiques de l'infection sont issus d'études rétrospectives hétérogènes. 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 contrôles, mais également les échantillons biologiques issus de ces patients. MONALISA a été menée 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 et s'est déroulée de Novembre 2009 à Juillet 2013. Elle a permis de collecter les échantillons de 813 malades (427 infections S, 252 infections N et 107 infections MN) et 456 témoins.

(site : http://www.recherchecliniquepariscentre.fr/wp-content/uploads/2012/01/monalisa_r%C3%A9sum%C3%A9_20090925_LLE.pdf).

Objectif principal: 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:

- 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).

Les inclusions sont achevées et l'analyse des données est en cours.

Cohorte nationale Observationnelle des Méningites Bactériennes communautaires de l'Adulte (COMBAT)

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

Le CNRL a contribué 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.

En 2013, 3 souches humaines ont été intégrées à COMBAT avec dans un cas, identification de la source alimentaire.

4.3. METHODES DE DIAGNOSTIC ET ATYPIES DES SOUCHES

Souches de *Listeria monocytogenes* non hémolytiques

Personnes impliquées 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.

Poster présenté à ISOPOL 2013(Goa, Inde) et aux Journées Départementales du Département Infection et Epidémiologie (Institut Pasteur, Paris, France)

Article en cours de rédaction

Listeriolysin O (LLO), the product of *hly* gene, is a major *Lm* virulence factor under the control of the transcriptional regulator PrfA. Moreover, β -haemolysis is a cardinal phenotypic marker used for *Lm* detection and identification in clinical microbiology. 70 non-haemolytic *Lm* strains isolated from human, food and environment (0.08 % of 92767 *Lm* strains) have been identified the *Listeria* French NRC and WHO collaborating centre collection. Here, we have characterized these isolates according to standard methods (phenotypic characterization, genosertotyping and PFGE), and investigated the molecular basis of their absence of haemolytic activity.

All the non-haemolytic strains presented a phenotype similar to Δ *prfA* strains, except 3 strains, which exhibited a PrfA activity similar to wild-type reference strains. The *hly* gene sequence analysis of these 3 strains revealed the presence of a new mutation (G299V) for two strains isolated from food and a premature stop codon in 484 position for the third one isolated from human. Restoration of haemolytic activity upon wild type *hly* gene conjugative transfer was observed, whereas transfer of these mutated *hly* versions did not confer haemolytic activity to non-haemolytic recipient strains (*Lm* Δ *hly* and *L. innocua*). When mice were inoculated by intravenous injection with a reference *Listeria monocytogenes* strain or the three spontaneous non-haemolytic strains, only animals infected with the *Lm* reference strain died. Day three of infection CFUs recovered in spleen and liver were 4 to 5 Logs lower in mice infected with non-haemolytic strains than with wild type.

Here we have revealed the existence of spontaneous non-haemolytic *Lm* strains isolated from food and human, shown that this lack of haemolytic activity is either due to a loss of function of PrfA or to mutations or truncation in LLO. Even if the virulence of these strains is strongly attenuated in mice, it should be noted that the non-haemolytic strain expressing a truncated LLO was isolated from an infected patient. These results demonstrate that although rare, non-haemolytic *Lm* can be isolated, and even though their virulence is strongly attenuated, they can cause infection.

Développement d'une méthode d'isolement de *Lm* dans les selles et études de gastroentérites à *Lm*

Personnes impliquées au CNRL : H. Dieye - A. Leclercq -V. Chenal Francisque - M. Lecuit
Communication orale présentée à ISOPOL 2013(Goa, Inde) par A. Leclercq: Febrile and septicemic gastroenteritis due to *L. monocytogenes*.

The foodborne origin of listeriosis has been demonstrated epidemiologically by Schlech III *et al.*, but the existence of gastrointestinal symptoms was not mentioned in this seminal study. Outbreaks of febrile gastroenteritis due to *Lm* have been described but systemic listeriosis is usually not observed in this setting. However, clinical studies have clearly shown that gastroenteritis often precedes the development of invasive listeriosis, even though the proof that *Lm* is the causative agent of this gastroenteritis preceding invasive listeriosis has not been formally established. Here, we have investigated cases of invasive listeriosis preceded by gastroenteritis notified recently to the Reference National Centre, obtained stools concomitant of this gastroenteritis episode, and developed a method to isolate *Lm* from stools samples, compared isolates from stool and blood samples.

Three cases of gastroenteritis preceding invasive listeriosis were studied. *Lm* was isolated from stool samples using ALOA™ medium (AES Laboratories, France), and the haemolytic activity of the isolate assessed on blood agar plate. For each patient, stool and blood *Lm* isolates belonged to the same serotype (1/2a and 1/2b) and exhibited similar combined *Ascl/ApaI* PFGE profiles. In these 3 isolates, the *inlA* gene did not encode a truncated InlA, transcription of *inlA* was demonstrated by qPCR and expression of a full-length InlA was detected on the surface of bacteria by IFI. Invasion assays in guinea pig fibroblasts transfected or not with human E-cadherin cDNA demonstrated the ability of these three isolates to invade cells in an InlA-dependent manner.

These results provide clinical and microbiological evidence that *Lm* induces febrile gastroenteritis prior to its systemic dissemination. They also indicate the in case of febrile gastroenteritis where other classical foodborne gastrointestinal pathogens are not detected, detection of *Lm*, notably in population at risk for listeriosis, may allow early antimicrobial therapy and prevent the severe complications of systemic listeriosis.

Caractérisation des souches de *L. monocytogenes* de sérotype 4ab

Personnes impliquées 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)
Poster présenté à ISOPOL 2013 (Goa, Inde)

Thirteen *Lm* serovars have been described (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e and 7), yet the existence of serovar 4ab is debated. The aim of our study was to further characterize "4ab" isolates deposited in the World Health Organization Collaborating Centre for *Listeria* (WHOCCL) collection by phenotypical tests, 16S rDNA and *iap* gene sequencing, and study by MLST their position in the structure of *Lm* population.

We retrieved 32 isolates from the collection of the WHOCCL typed as *Lm* serovar 4ab. Only one of these 32 strains was confirmed as a *Lm* serovar 4ab. MLST showed that this unique 4ab *Lm* isolate belongs to a clonal complex of serovar 4c strains, suggesting that this 4ab isolate derives from 4c strains. Importantly, the two serotyping reference 4ab strains CLIP 74909 (=SLCC 4951) and CLIP 73010 are both *L. innocua* and belong to serovar 6b.

These results confirm the existence of *Lm* serovar 4ab. The analysis of the genomic sequence of *Lm* CLIP 17147 isolate will help clarify its position in the *Lm* species and other species of this genus.

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

Bacteriophages as a driving force for serovar diversity in *Listeria monocytogenes*: serovar 3 and 7 feature mutations in teichoic acid glycosylation genes of serovar 1/2

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

En collaboration avec Marcel R. Eugster et Martin J. Loessner (Institute of Food, Nutrition and Health, ETH Zurich, Switzerland). Le CNRL ayant communiqué sa collection rare de *L. monocytogenes* de serotype 7.

Poster présenté à ISOPOL 2013 (Goa, Inde). Abstract P/BIO/11 page 54

L. monocytogenes is a phenotypically diverse organism, encompassing 13 distinct serovars based on somatic (O) and flagellar (H) antigens. To correlate phenotypes with genomic variations, we performed detailed analysis of wall teichoic acid (WTA) glycosylation-associated genes in serovars 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, and 7 strains. It is known that O-antigen specificity is determined by various sugar substitutions in WTA, e.g., N-acetylglucosamine (GlcNAc) and rhamnose (Rha) in serovar 1/2, Rha in serovar 3, and no sugar substituents in serovar 7. We identified a set of genes responsible for WTA glycosylation in those strains. Inactivation of specific genes resulted in a lack of either GlcNAc or Rha in WTA. Surprisingly, all investigated strains of serovars 3a, 3b, and 3c revealed mutations in genes involved in WTA rhamnosylation. In serovar 7 strains, we found that WTA glycosylation for both GlcNAc and Rha is defect by mutations in essential genes for both modifications. Single and double complementation in serovar 3 and 7 strains completely restored the characteristic serovar 1/2-specific WTA carbohydrates and phenotype. These findings suggest that *L. monocytogenes* strains of serovar 3 (frequent) and serovar 7 (rare) have diverged from serovar 1/2 strains by mutation in either Rha (serovar 3) or both Rha and GlcNAc (serovar 7) glycosylation genes.

Regarding the driving force responsible for changes in WTA glycosylation, we found that the lack of Rha and/or GlcNAc substitution is accompanied by phage resistance, i.e., abolished phage absorption. In fact, naturally occurring phage-resistant isolates were found to harbor similar SNPs in WTA glycosylation genes, resulting in loss of WTA carbohydrates and phage binding ligands. Complementation of such strains with intact gene copies restored both phage susceptibility and serovar 1/2 somatic antigens. We conclude that phage resistance appears to be a primary effector influencing evolution and variation among *Lm* serovars.

4.4. ETUDES DE LA VIRULENCE

Etude de l'expression par *L. monocytogenes* d'InlA

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

L'internaline (InlA) de *Lm* permet son internalisation dans les cellules épithéliales et la traversée des barrières intestinale et placentaire *in vivo*. C'est un facteur de virulence majeur de la bactérie. Certaines souches expriment une InlA tronquée, non-fonctionnelle pour l'entrée, et donc associée à une hypovirulence. Nous avons étudié un grand nombre d'isolats du CNRL préalablement typés par MLST et pour lequel l'intégralité du gène *inlA* a été également séquencé. Les résultats de cette étude vont aboutir à une méthode simple de caractérisation des souches quant à leur expression en surface d'InlA. Nous investiguons également la fréquence de cette troncature au sein de différents groupes PCR de *L. monocytogenes*, et étudions les caractéristiques phénotypiques de ces souches exprimant une InlA tronquée.

4.5. TAXONOMIE

Suite au congrès ISOPOL, le CNRL participe à la révision du genre *Listeria* et l'inclusion de nouvelles espèces en relation avec les données récentes de la génomique.

4.6. DEVELOPPEMENT DE NOUVEAUX OUTILS DE TYPAGE MOLECULAIRE

Développement d'un schéma de référence de multilocus variable-number of tandem repeats analysis (MLVA) pour Lm

*Personnes impliquées au CNRL : V. Chenal Francisque - T. Cantinelli - A. Leclercq - M. Lecuit
En Collaboration avec S. Brisse (Institut Pasteur) et C. Pourcel (Institut de génétique et Microbiologie, Université Paris-Sud, Orsay).
Poster présenté à ISOPOL 2013 (Goa, Inde) et à l'International Meeting on Microbial Epidemiological Markers (IMMEM, Paris).
Article paru : V. Chenal-Francisque et coll. 2013. J. Clin. Microbiol. 51(6):1868-80. (10)*

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

Amélioration de la surveillance de la listériose par l'ajout de SmaI au sous-typage PFGE Ascl/ApaI de Lm

*Personnes impliquées au CNRL : V. Chenal Francisque - T. Cantinelli - H. Dieye - A. Morvan - A. Leclercq - M. Lecuit
Poster présenté à ISOPOL 2013 (Goa, Inde)*

Pulse-field gel electrophoresis (PFGE) is the reference method for detecting and investigating clusters of human cases or outbreaks of listeriosis. Even if there is a standardized Pulsenet PFGE protocol based on the utilization of the restriction endonucleases *Ascl* and *ApaI*, PFGE results are sometimes not sufficient to investigate clusters of human cases or outbreaks caused by endemic isolates. In order to increase the discriminatory power of PFGE, a third restriction endonuclease, *SmaI*, can be used. We present here our latest developments of the *SmaI* PFGE protocol.

SmaI PFGE parameters have been adapted and optimized, and reference strains for *Lm* serotypes, the main strains from French outbreaks and 900 isolates from human, food and environmental origins have been typed with *SmaI* PFGE. As for PFGE with *Ascl* and *ApaI*, *SmaI* clusters isolates of the same serotypes. The addition of *SmaI* increases the discriminative power obtained with the combination of *Ascl* and *ApaI* and is useful for the epidemiological surveillance of isolates of endemic *Ascl/ApaI* combined profiles. This was illustrated in the investigation of the recent 2012 French outbreak due to an endemic profile that we successfully investigated with *SmaI* PFGE subtyping.

4.7. ETUDE DE LA DIVERSITE DES LISTERIA

Biodiversité des Listeria

*Personnes impliquées au CNRL : V. Chenal Francisque - T. Cantinelli - A. Leclercq - M. Lecuit
Financement Institut Pasteur ANSES*

En collaboration avec M. Maury et S. Brisse (Unité de Génomique évolutive des Microbes) 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.

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.

Les données du projet sont en cours d'exploitation au regard des données de génomique.

Biodiversité des clones majeurs de *L. monocytogenes* d'origine alimentaire

*Personnes impliquées au CNRL : V. Chenal Francisque - T. Cantinelli - A. Leclercq - M. Lecuit
Financement Institut Pasteur ANSES*

En collaboration avec S. Brisse (Unité de Génomique évolutive des Microbes) et le LNR de l'ANSES (A. Brisabois et S. Roussel).

Poster présenté à ISOPOL 2013 (Goa, Inde).

To help epidemiological investigation and to define clones (groups of genetically similar isolates descending from a common ancestor), different molecular methods, especially PFGE and MLST, have been used. Recent studies indicated that a few clones were responsible for a majority of past outbreaks of listeriosis in France. However, only few data on the genetic diversity of food strains in France are available.

The objective was to analyse the diversity of clones according to the food sources, over ten years, between 2000 and 2010. The genetic diversity of strains included in the database of the French National Reference Laboratory (NRL) was analyzed. A panel of 135 isolates, representative of the frequent serogroups and PFGE types of the NRL database, was typed by MLST in order to delineate prevalent LM clones. MLST separated the strains into 45 different STs (Sequence Types) and 22 CCs (Clonal Complexes). The STs were specifically associated to each serogroup with a few exceptions. The most frequent clones observed here corresponded to major clones previously described (CC5, CC6: Lineage I; CC121, CC9: Lineage II). Our results show that these clones were not associated to a given food source. The STs and CCs correlated with the PFGE types, suggesting the possible set up of a dictionary between MLST and PFGE. This study revealed also that the CC121 appeared to be frequently detected in food.

The confirmation of these preliminary results and the analysis of the whole genome of food strains of CC121 are in process and should contribute to evaluate the risk presented by this CC for public health. In the next months, we intend to assess the prevalence of CC121 strains in Europe, through the use of the molecular typing database of the European Union Reference Laboratory LM (EURL LM DB).

La nature ubiquitaire des clones de *L. monocytogenes* : une étude MLST à grande échelle

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

En collaboration avec l'Environmental Research Institute and Department of Microbiology, University College Cork, Ireland (J. Haase and M. Achtman)

Article paru J. Haase et coll. 2013. *Environ. Microbiol.* 16(2):405-16. (27)

We used MultiLocus Sequence Typing (MLST) of ~2,000 isolates of *L. monocytogenes* to investigate whether specific associations existed between clonal complexes (CCs) and the environment versus diseased host. Most CCs (72%) were not specific for any single source, and many have been isolated from the environment, food products, animals as well as from humans. Our results confirm that the population structure of *Lm* is largely clonal, and consists of four lineages (I-IV), three of which contain multiple CCs. Most CCs have remained stable for decades but one epidemic clone (CC101) was common in the mid-1950's and very rare until recently when it may have begun to re-emerge. The historical perspective used here indicates that the central sequence types of CCs were not ancestral founders but have rather simply increased in frequency over decades.

Séquençage du génome complet d'isolats de *L. monocytogenes*

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

En collaboration avec Sylvain Brisse, Unité de génomique évolutive des microbes, Institut Pasteur.

Le séquençage de génomes complets d'isolats représentatifs des souches cliniques et alimentaires est en cours. Leur annotation et la comparaison de ces génomes permettront de mieux comprendre la biodiversité de *Listeria*, d'identifier des génotypes éventuellement associés à l'hypervirulence et/ou l'hypovirulence, et de développer des outils d'analyse et de typage qui pourront être intégrés à la surveillance épidémiologique et microbiologique de la listériose.

4.8. ETUDE DE LA RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES

Caractérisation d'un isolat clinique *Lm* résistant à la Rifampicine

Personnes impliquées au CNRL : V. Chenal-Franicsque - C. Charlier-Woerther - A. Leclercq - M. Lecuit

En collaboration avec P. Courvalin et S. Mehvish (Unité des Agents antimicrobiens)

Article Paru : V. Chenal-Franicsque et coll. 2013. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58(3):1829-30. (9)

Antibiotic resistance is exceptional in *Lm*, which is sensitive to most clinically relevant antibiotics. Here, we report the first characterization of a human clinical isolate highly resistant to rifampin. The *rpoB* gene which encodes the RNA polymerase subunit Beta, exhibits a missense mutation in a conserved domain previously shown to be associated with rifampin resistance.

4.9. PROJETS COLLABORATIFS

Le CNRL est associé à des travaux collaboratifs :

- avec des entités de l'Institut Pasteur : Unité des Interactions Bactéries Cellules (P. Cossart), Unité de Génomique évolutive des Microbes (S. Brisse)
- Hôpital Necker-Enfants malades (APHP), CIC Necker (MONALISA).
- Projets européens Eranet (Listress, Proantilis)
- un projet international (Sinergia, Fonds national suisse)
- Autres projets de recherche de l'Unité de Biologie des Infections

5. LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

La liste des publications du CNRL depuis sa création est disponible et actualisée sur son site web.

5.1. PUBLICATIONS NATIONALES

Le Lamer, S., I. Desforges, and A. Leclercq. Octobre 2013. **Le Point sur : les *Listeria***. bioMérieux Lettre de veille Normative. bioMérieux, Marcy l'Etoile.

5.2. PUBLICATIONS INTERNATIONALES

Hmaied, F., S. Helel, V. Le Berre, J. M. Francois, A. Leclercq, M. Lecuit, H. Smaoui, A. Kechrid, A. Boudabous, and I. Barkallah. 2014. **Prevalence, identification by a DNA microarray-based assay of human and food isolates *Listeria* spp. from Tunisia**. Pathol Biol (Paris) 62(1):24-9.

Chenal-Francisque, V., C. Charlier, S. Mehvish, H. Dieye, A. Leclercq, P. Courvalin, and M. Lecuit. **Highly Rifampin-Resistant *Listeria monocytogenes* Isolated from a Patient with Prosthetic Bone Infection**. Antimicrob Agents Chemother 58(3):1829-30.

Haase, J. K., X. Didelot, M. Lecuit, H. Korkeala, *L. monocytogenes* MLST study group (A. Leclercq, K. Grant, M. Wiedmann, Petra Apfalter) and M. Achtman. 2013. **The ubiquitous nature of *Listeria monocytogenes* clones: a large-scale Multilocus Sequence Typing study**. Environ Microbiol. 16(2):405-16.

Disson, O., and M. Lecuit. 2013. **In vitro and in vivo models to study human listeriosis: mind the gap**. Microbes Infect 15:971-80.

Cantinelli, T., V. Chenal-Francisque, L. Diancourt, L. Frezal, A. Leclercq, T. Wirth, M. Lecuit, and S. Brisse. 2013. **"Epidemic Clones" of *Listeria monocytogenes* Are Widespread and Ancient Clonal Groups**. J Clin Microbiol. 51(11):3770-9.

Lazarus, C., A. Leclercq, M. Lecuit, V. Vaillant, B. Coignard, H. Blanchard, I. Novakova, and P. Astagneau. 2013. **Probable nosocomial transmission of listeriosis in neonates**. J Hosp Infect. 85(2):159-60

Charlier, C., F. Goffinet, E. Azria, A. Leclercq, and M. Lecuit. 2013. **Inadequate management of pregnancy-associated listeriosis: lessons from four case-reports**. Clin Microbiol Infect. 20(3):246-9.

J. Zuk, S. Bazan-Socha, J. Zarychta, A. Leclercq, M. Lecuit, A. Le Flèche-Matéos, J. Orłowska-Heitzman, and J. Musiał. 2013. **Disseminated nocardiosis mimicking exacerbation of pulmonary Sarcoidosis**. Sarcoidosis Vasculitis and Diffuse Lung Diseases. 30(1):65-9.

Chenal-Francisque, V., L. Diancourt, T. Cantinelli, V. Passet, C. Tran-Hykes, H. Bracq-Dieye, A. Leclercq, C. Pourcel, M. Lecuit, and S. Brisse. **Optimized Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis Assay and Its Complementarity with Pulsed-Field Gel Electrophoresis and Multilocus Sequence Typing for *Listeria monocytogenes* Clone Identification and Surveillance**. J Clin Microbiol 51(6):1868-80.

5.3. CHAPITRES DE LIVRES

Lecuit, M., and C. Charlier. *Listériose*. Chapitre 67. Pilly Edition 2014.

Charlier, C., and M. Lecuit. Fiches e-POPI *Micrococcus, Listeria, Fusarium, Geotrichum* et *Malassezia*.

Leclercq, A. *Listeria monocytogenes*, Chapitre 4. p. 74-94 In D. Drider and G. Salvat (ed.), *Sécurité Sanitaire des Aliments : Epidemiologie et moyens de luttés contre les principaux contaminants zoonotiques des aliments*. Economica, Paris, *In Press*.

Leclercq, A., A. Oevermann, R. Danguy-des-Déserts, Sophie Granier, Thomas Hammack, Karen Jinneman, Yi Chen, Robert Rathbone, Garlon Riegler. *Listeria monocytogenes*. Chapitre 2.9.7. In OIE Terrestrial Manual. World Organization for Animal Health (OIE), Paris, *Submitted to world assembly of delegates of the OIE*.

5.4. COMMUNICATIONS NATIONALES

14^{èmes} Journées nationales d'Infectiologie, Clermont Ferrand, Juin 2013. Session Best Of. Charlier, C. Actualités Infections femmes enceintes.

Journée Pathogènes alimentaires. Thermo Fisher Scientific (Oxoid), West Events, Nantes, 24 Septembre 2013. Leclercq, A. Surveillance humaine et alimentaire des *Listeria*: Bilan et perspectives sur les méthodes analytiques et les réglementations.

Journée Départementale du département Infection et Epidémiologie. Institut Pasteur, Belle Eglise, 30 Septembre et 01 Octobre 2013. Poster. Dieye, H., V. Chenal-Francisque, L. Han, A. Leclercq, M. Scotti, A. Vazquez-Boland, and M. Lecuit. Characterization of non-haemolytic *Listeria monocytogenes* isolates. Abstract P-12, page 74.

Program UE Europe "Microbial Evolution and Molecular Epidemiology". Ecole Normale Supérieure, Lyon, (2013), 23 Janvier 2013. Lecuit, M. *Listeria monocytogenes* crossing of host barriers.

SFR Biosciences Gerland Seminar Series, Lyon, 18 Février 2013. Lecuit, M. *Listeria monocytogenes* and the intestinal barrier: invasion and host responses.

Seminar series, Inserm U 1002. Institut Necker & Necker-Enfants malades Medical School, Paris, 20 mars 2013. Lecuit, M. *Listeria monocytogenes* crossing of the intestinal barrier: invasion and host responses.

5.5. COMMUNICATIONS INTERNATIONALES

European congress of Clinical Microbiology and Infectious diseases. International Congress Centre Berlin, Berlin, Allemagne, 27-30 Avril 2013. Poster. Charlier, C., B. Cazenave, A. Leclercq, J. Podevin, D. Assomany, L. Guilbert, and M. Lecuit. 2013. *Listeria monocytogenes*-associated biliary tract infections: analysis of 18 cases. Abstract P2102 page 171.

European congress of Clinical Microbiology and Infectious diseases. International Congress Centre Berlin, Berlin, Allemagne, 27-30 Avril 2013. Poster. Shoai-Tehrani, M., A. Leclercq, M. Lecuit, C. Charlier, on behalf of the endovascular listeriosis study group. 2013. Endovascular listeriosis: a series of 12 consecutive cases. Abstract P2098 page 171.

ISOPOL (International Symposium on Problems of Listeriosis). 2013. Goa (India). 19-22 Septembre 2013. Poster. Dieye, H., V. Chenal-Francisque, L. Han, A. Leclercq, M. Scotti, A. Vazquez-Boland, and M. Lecuit. Characterization of non-haemolytic *Listeria monocytogenes* isolates. Abstract P/BIO/08 page 50.

ISOPOL (International Symposium on Problems of Listeriosis). 2013. Goa (India). 19-22 Septembre 2013. Poster. Pezzuto, A. I. Drigo, A. Piovesana, C. Bacchin, D. Comin, A. Leclercq, A. Morvan, A. Cereser, and M. Fravetti. *Listeria monocytogenes* in fresh and seasoned homemade salami: serotype prevalence. Abstract P/DS/06 page 83.

ISOPOL. 2013. Goa (India). 19-22 Septembre 2013. Poster. Roussel, S., V. Chenal-Francisque, G. Pontdeme, M. Lecuit, S. Brisse, and A. Brisabois. Genetic diversity of major clones of *Listeria monocytogenes* from food sources. Abstract P/DS/08 page 86.

ISOPOL. 2013. Goa (India). 19-22 Septembre 2013. Poster. A. Leclercq, V. Cadet-Daniel, A. Morvan, T. Cantinelli, V. Chenal-Francisque, and M. Lecuit. Does *Listeria monocytogenes* serovar 4ab exist? Abstract P/DS/09 page 87.

ISOPOL. 2013. Goa (India). 19-22 Septembre 2013. Poster. Chenal-Francisque, V., L. Diancourt, T. Cantinelli, V. Passet, C. Tran-Hykes, H. Bracq-Dieye, A. Leclercq, C. Pourcel, M. Lecuit, and S. Brisse. An optimized MLVA assay for *Listeria monocytogenes* clone identification and surveillance. Abstract P/DS/11 page 89.

ISOPOL. 2013. Goa (India). 19-22 Septembre 2013. Poster. Leclercq, A., V. cadet-Daniel, H. Dieye, A. Morvan, T. Cantinelli, V. Chenal-Francisque, and M. Lecuit. Improvement of listeriosis surveillance by adding *Sma*I to *Listeria monocytogenes* *Ascl*/*Apal* PFGE subtyping. Abstract P/DS/12 page 90.

ISOPOL. 2013. Goa (India). 19-22 Septembre 2013. Poster. Leclercq, A., S. Roussel, J. Santolini, A. Agbessi, V. Chenal-Francisque, R. Lailler, M. Lecuit, N. Pihier, and A. Brisabois. French surveillance of *Listeria monocytogenes* in food from 2006 to 2011. Abstract P/PC/10 page 215.

ISOPOL. 2013. Goa (India). 19-22 Septembre 2013. Communication orale. Dieye, H., O. Disson, A. Leclercq, V. Chenal-Francisque, and M. Lecuit. Febrile and septicemic gastroenteritis due to *Listeria monocytogenes*. Abstract O/EPI/02 page 157.

ISOPOL. 2013. Goa (India). 19-22 Septembre 2013. Communication orale. Charlier, C., A. Leclercq, V. Goulet, O. Lortholary, P. Ravaud, and M. Lecuit. MONALISA: Multicentric observational national analysis on listeriosis and *Listeria*. Abstract O/EPI/03 page 158.

10th International Meeting on Microbial Epidemiological Markers (IMMEM-10). Institut Pasteur, Paris, France. Poster. Chenal-Francisque, V., L. Diancourt, T. Cantinelli, V. Passet, C. Tran-Hykes, H. Bracq-Dieye, A. Leclercq, C. Pourcel, M. Lecuit, and S. Brisse. An optimized MLVA assay for *Listeria monocytogenes* clone identification and surveillance. Poster 225.

Présentation sur les épidémies de *Listeria*, European *Listeria* typing Exercise (ELiTE) meeting. ECDC, Stockholm, 28-29 Novembre 2013. Leclercq, A., V. Chenal-Francisque, M. Lecuit, M. Tourdjmann, E. Laurent, H. de Valk, S. Salah, and N. Pihier. Detection of a listeriosis cluster of cases linked to cheese (France, 2013).

5.6. CONFÉRENCES SUR INVITATIONS

10th European Initiative for Basic Research in Microbiology and Infectious Diseases, Max Planck Institute for Infection Biology. Berlin / Saint Maximin la Ste Baume, 2-4/10/13. M. Lecuit. *Listeria monocytogenes* interactions with the intestinal barrier.

A Day on Infection associated Diseases. Braunschweig, 21/11/13. M. Lecuit. *Listeria monocytogenes* invasion of host tissues.

23rd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Symposium Pathogenesis of infections due to intracellular bacteria. Berlin, Germany, 27-30/04/13. M. Lecuit. Targeting of the central nervous system by *Listeria monocytogenes*.

ISOPOL. 2013. Goa (India). 19-22 Septembre 2013. Communication orale. Lecuit, M. *Listeria monocytogenes* crossing of the intestinal barrier and within-host dissemination. Abstract PI 7/A page 8.

Eranet pathogenomics Listress meeting. Madrid, Spain, 13/04/13. M. Lecuit. Murinization of internalin extends its receptor repertoire, altering *Listeria monocytogenes* cell tropism and host responses.

ESCMID postgraduate course, Intracellular Bacteria: From Biology to Clinic. Villars-sur-Ollon, Switzerland, 26-30 Aout 2013. M. Lecuit. Clinical listeriosis.

ESCMID postgraduate course, Intracellular Bacteria: From Biology to Clinic. Villars-sur-Ollon, Switzerland, 26-30 Aout 2013. M. Lecuit. *Listeria* pathogenesis

ESCMID postgraduate course, Intracellular Bacteria: From Biology to Clinic. Villars-sur-Ollon, Switzerland, 26-30 Aout 2013. M. Lecuit. *Listeria* genomics.

Journée Worldwide Food Science. Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, 26 Septembre 2013. Leclercq, A. *Listeria monocytogenes*; *Listeria spp.* Representative collection of the population diversity? Needs and targets.

Invitation Afnor Validation domaine agroalimentaire. Afnor, La Plaine Stade de France, 06 Mai 2013. Leclercq, A. *Listeria monocytogenes*, *Listeria spp.* Collection représentative de la diversité ? Définition des besoins.

5.7. PRESENCE DANS LES MEDIAS

Formation continue infirmière : Interview pour « le Journal de l'infirmière Libérale ». Charlier, C. Journal de l'infirmière libérale, décembre 2013.

Mystères de la science biomédicale. Institut Pasteur, Paris, 12 Février 2013. M. Lecuit. *Listeria monocytogenes* : des aliments au cerveau.

6. PROGRAMME D'ACTIVITE POUR LES ANNEES 2014-2015

Outre la poursuite des activités de surveillance et d'expertise, le programme de travail plus spécifique du CNRL pour les années 2014-2015 est le suivant :

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

- Evaluation de l'intérêt de l'intégration de la MLST et du séquençage complet du génome pour la surveillance nationale microbiologique, qui se fonde actuellement sur la PFGE ;
- Evaluation de la dynamique des clones et pulsotypes au sein des souches réceptionnées dans le cadre de la surveillance ;

Aspects diagnostiques :

- Evaluations d'algorithmes diagnostiques cliniques grâce à l'étude MONALISA ;
- Evaluation des performances comparées des différents tests PCR et/ou sérologiques actuellement disponibles dans le diagnostic de listériose à partir des données clinico-biologiques obtenus grâce à l'étude MONALISA ;
- Evaluation de la virulence des souches de *Listeria monocytogenes*, et mise en évidence des caractéristiques génotypiques et phénotypiques différenciant les souches cliniques des souches environnementales notamment alimentaires.

Aspects thérapeutiques :

- Evaluation de l'antibiorésistance des *Lm*;
- Evaluation d'alternatives thérapeutiques dans le traitement de la listériose neuroméningée.

Aspects cliniques :

- Analyse et revue des données clinico-biologiques relatives aux souches d'origine humaine reçues au CNRL ;
- Analyse des données clinico-biologiques des cas de listérioses (MONALISA)

Aspects préventifs:

- Préciser les facteurs de risque de listériose (MONALISA)
- Etablir des recommandations ciblées pour les différentes populations à risque

7. REFERENCES

1. **Anonyme.** 2008. Commission decision of 28 April 2008 amending Decision 2002/253/EC laying down case definitions for reporting communicable diseases to the Community network under Decision No 2119/98/EC of the European Parliament and of the Council, p. 46-90, Official Journal of the European Union.
2. **Anonyme.** 2012. European Manual of Clinical microbiology, 1st ed. SFM & ESCMID, Paris, France.
3. **Anonyme.** 2002. Règlement (CE) No 178/2002 du parlement européen et du conseil du 28 janvier 2002 établissant les principes généraux et les prescriptions générales de la législation alimentaire, instituant l'Autorité européenne de sécurité des aliments et fixant des procédures relatives à la sécurité des denrées alimentaires. Journal officiel des Communautés européennes:1-24.
4. **Anonyme.** 2007. Règlement (CE) no 1441/2007 de la Commission du 5 décembre 2007 modifiant le règlement (CE) no 2073/2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires. Journal officiel des Communautés européennes 0012 - 0029.
5. **Aureli, P., G. C. Fiorucci, D. Caroli, G. Marchiaro, O. Novara, L. Leone, and S. Salmaso.** 2000. An outbreak of febrile gastroenteritis associated with corn contaminated by *Listeria monocytogenes*. N Engl J Med **342**:1236-41.
6. **Charlier-Woerther, C., A. Leclercq, O. Lortholary, and M. Lecuit.** 2009. [Listeriosis, a rare but severe foodborne infection]. Rev Prat **59**:905-11.
7. **Charlier, C., A. Leclercq, B. Cazenave, N. Desplaces, L. Travier, T. Cantinelli, O. Lortholary, V. Goulet, A. Le Monnier, and M. Lecuit.** *Listeria monocytogenes*-associated joint and bone infections: a study of 43 consecutive cases. Clin Infect Dis **54**:240-8.
8. **Chen, J., L. Jiang, X. Chen, X. Luo, Y. Chen, Y. Yu, G. Tian, D. Liu, and W. Fang.** 2009. *Listeria monocytogenes* serovar 4a is a possible evolutionary intermediate between *L. monocytogenes* serovars 1/2a and 4b and *L. innocua*. J Microbiol Biotechnol **19**:238-49.
9. **Chenal-Francois, V., C. Charlier, S. Mehvish, H. Dieye, A. Leclercq, P. Courvalin, and M. Lecuit.** Highly Rifampin-Resistant *Listeria monocytogenes* Isolated from a Patient with Prosthetic Bone Infection. Antimicrob Agents Chemother **58**:1829-30.
10. **Chenal-Francois, V., L. Diancourt, T. Cantinelli, V. Passet, C. Tran-Hykes, H. Bracq-Dieye, A. Leclercq, C. Pourcel, M. Lecuit, and S. Brisse.** Optimized Multilocus variable-number tandem-repeat analysis assay and its complementarity with pulsed-field gel electrophoresis and multilocus sequence typing for *Listeria monocytogenes* clone identification and surveillance. J Clin Microbiol **51**:1868-80.
11. **Chenal-Francois, V., J. Lopez, T. Cantinelli, V. Caro, C. Tran, A. Leclercq, M. Lecuit, and S. Brisse.** Worldwide distribution of major clones of *Listeria monocytogenes*. Emerg Infect Dis **17**:1110-2.
12. **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.
13. **Dalton, C. B., C. C. Austin, J. Sobel, P. S. Hayes, W. F. Bibb, L. M. Graves, B. Swaminathan, M. E. Proctor, and P. M. Griffin.** 1997. An outbreak of gastroenteritis and fever due to *Listeria monocytogenes* in milk. N Engl J Med **336**:100-5.
14. **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.
15. **Doumith, M., C. Buchrieser, P. Glaser, C. Jacquet, and P. Martin.** 2004. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. J Clin Microbiol **42**:3819-22.
16. **FAO, and OMS.** 2002. Exemple de la cellule "Listeria", Conférence paneuropéenne sur la sécurité sanitaire et la qualité des aliments, document de séance de la délégation française, Budapest, Hongrie.
17. **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.** Evaluation of the

- Andromas matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system for identification of aerobically growing Gram-positive bacilli. *J Clin Microbiol* **50**:2702-7.
18. **Gholizadeh, Y., C. Poyart, M. Juvin, J. L. Beretti, J. Croize, P. Berche, and J. L. Gaillard.** 1996. Serodiagnosis of listeriosis based upon detection of antibodies against recombinant truncated forms of listeriolysin O. *J Clin Microbiol* **34**:1391-5.
 19. **Gilchrist, M.** 2009. Cutaneous *Listeria* infection. *Br J Hosp Med (Lond)* **70**:659.
 20. **Goulet, V., M. Hebert, C. Hedberg, E. Laurent, V. Vaillant, H. De Valk, and J. C. Desenclos.** 2012. Incidence of listeriosis and related mortality among groups at risk of acquiring listeriosis. *Clin Infect Dis* **54**:652-60.
 21. **Goulet, V., C. Hedberg, A. Le Monnier, and H. de Valk.** 2008. Increasing incidence of listeriosis in France and other European countries. *Emerg Infect Dis* **14**:734-40.
 22. **Goulet, V., L. A. King, V. Vaillant, and H. de Valk.** 2013. What is the incubation period for listeriosis? *BMC Infect Dis* **13**:11.
 23. **Goulet, V., A. Leclercq, V. Vaillant, A. Le Monnier, E. Laurent, F. Thierry-Bled, N. Pihier, and H. De Valk.** 2008. Recrudescence récente des cas de listériose en France. *Bull. Epidemiol. Bebdom.* **30-31**:268-272.
 24. **Goulet, V., Leclercq, A., Laurent E., King, L.A., Chenal-Francisque, V., Vaillant, V., Letort, M.J., Lecuit, M., H. de Valk.** . 2012. Surveillance de la listériose humaine en France, 1999-2011. . *Bull. Epidemiol. Bebdom. Hors Série.* **9 mai 2012.**:38-40.
 25. **Granier, S. A., C. Moubareck, C. Colaneri, A. Lemire, S. Roussel, T. T. Dao, P. Courvalin, and A. Brisabois.** Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolates from food and the environment in France over a 10-year period. *Appl Environ Microbiol* **77**:2788-90.
 26. **Graves, L. M., and B. Swaminathan.** 2001. PulseNet standardized protocol for subtyping *Listeria monocytogenes* by macrorestriction and pulsed-field gel electrophoresis. *Int J Food Microbiol* **65**:55-62.
 27. **Haase, J. K., X. Didelot, M. Lecuit, H. Korkeala, and M. Achtman.** 2013. The ubiquitous nature of *Listeria monocytogenes* clones: a large-scale Multilocus Sequence Typing study. *Environ Microbiol* **16**:405-16.
 28. **Haase, J. K., R. A. Murphy, K. R. Choudhury, and M. Achtman.** Revival of Seeliger's historical 'Special *Listeria* Culture Collection'. *Environ Microbiol* **13**:3163-71.
 29. **Halpin, J. L., N. M. Garrett, E. M. Ribot, L. M. Graves, and K. L. Cooper.** Re-evaluation, optimization, and multilaboratory validation of the PulseNet-standardized pulsed-field gel electrophoresis protocol for *Listeria monocytogenes*. *Foodborne Pathog Dis* **7**:293-8.
 30. **Hmaied, F., S. Helel, V. Le Berre, J. M. Francois, A. Leclercq, M. Lecuit, H. Smaoui, A. Kechrid, A. Boudabous, and I. Barkallah.** 2014. Prevalence, identification by a DNA microarray-based assay of human and food isolates *Listeria* spp. from Tunisia. *Pathol Biol (Paris)* **62**:24-9.
 31. **Hof, H.** 2013. Chemotherapy of *Listeria* infections. *GMS Infectious diseases* **1**:1-10.
 32. **Ivanek, R., Y. T. Grohn, L. W. Tauer, and M. Wiedmann.** 2004. The cost and benefit of *Listeria monocytogenes* food safety measures. *Crit Rev Food Sci Nutr* **44**:513-23.
 33. **Jacquet, C., M. Doumith, J. I. Gordon, P. M. Martin, P. Cossart, and M. Lecuit.** 2004. A molecular marker for evaluating the pathogenic potential of foodborne *Listeria monocytogenes*. *J Infect Dis* **189**:2094-100.
 34. **Khen, B. K., O. A. Lynch, J. Carroll, D. A. McDowell, and G. Duffy.** 2014. Occurrence, Antibiotic Resistance and Molecular Characterization of *Listeria monocytogenes* in the Beef Chain in the Republic of Ireland. *Zoonoses Public Health*.
 35. **Le Monnier, A., E. Abachin, J. L. Beretti, P. Berche, and S. Kayal.** Diagnosis of *Listeria monocytogenes* meningoenzephalitis by real-time PCR for the hly gene. *J Clin Microbiol* **49**:3917-23.
 36. **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.
 37. **Lecuit, M., D. M. Nelson, S. D. Smith, H. Khun, M. Huerre, M. C. Vacher-Lavenu, J. I. Gordon, and P. Cossart.** 2004. Targeting and crossing of the human maternofetal barrier by *Listeria monocytogenes*: role of internalin interaction with trophoblast E-cadherin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:6152-7.
 38. **Lecuit, M., S. Vandormael-Pournin, J. Lefort, M. Huerre, P. Gounon, C. Dupuy, C. Babinet, and P. Cossart.** 2001. A transgenic model for listeriosis: role of internalin in crossing the intestinal barrier. *Science* **292**:1722-5.

39. Liu, D., M. L. Lawrence, A. J. Ainsworth, and F. W. Austin. 2007. Toward an improved laboratory definition of *Listeria monocytogenes* virulence. *Int J Food Microbiol* **118**:101-15.
40. Lyytikäinen, O., T. Autio, R. Maijala, P. Ruutu, T. Honkanen-Buzalski, M. Miettinen, M. Hatakka, J. Mikkola, V. J. Anttila, T. Johansson, L. Rantala, T. Aalto, H. Korkeala, and A. Siitonen. 2000. An outbreak of *Listeria monocytogenes* serotype 3a infections from butter in Finland. *J Infect Dis* **181**:1838-41.
41. Morvan, A., C. Moubareck, A. Leclercq, M. Herve-Bazin, S. Bremont, M. Lecuit, P. Courvalin, and A. Le Monnier. 2010. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* strains isolated from humans in France. *Antimicrob Agents Chemother* **54**:2728-31.
42. Muller, A., K. Rychli, M. Muhterem-Uyar, A. Zaiser, B. Stessl, C. M. Guinane, P. D. Cotter, M. Wagner, and S. Schmitz-Esser. Tn6188 - a novel transposon in *Listeria monocytogenes* responsible for tolerance to benzalkonium chloride. *PLoS One* **8**:e76835.
43. Ooi, S. T., and B. Lorber. 2005. Gastroenteritis due to *Listeria monocytogenes*. *Clin Infect Dis* **40**:1327-32.
44. 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.
45. Richard, S., C. Oggioni, C. Jacquet, E. Laurent, F. Lequerrec, N. Quelquejeu, and V. Goulet. 2004. Investigations autour de cas de listériose neuroméningée: bilan de 1è mois de fonctionnement. *Bull. Epidemiol. Hebdom.* **9**:35-36.
46. Roussel S., L., A., Santolini, A., Agbessi, A., Chenal-Francisque, V., Lailler, R., Lecuit, M., Pihier, N., Brisabois, A. . 2012. Surveillance des *Listeria monocytogenes* dans les aliments. . *Bull. Epidemiol. Bebdom. Hors série.* **9 mai 2012**:41-45.
47. Swaminathan, B., and P. Gerner-Smidt. 2007. The epidemiology of human listeriosis. *Microbes Infect* **9**:1236-43.

ANNEXE A. HISTORIQUE ET MISSIONS DU CNRL

A.1. HISTORIQUE

La Direction Générale de la Santé (DGS) a mis en place depuis 1982 une surveillance nationale de la listériose [En 2007, Swaminathan et Gerner-Smidt du CDC d'Atlanta ont signalé l'efficacité du modèle français de surveillance de la listériose (47)], avec le Centre National de Référence des *Listeria* localisé initialement à la Faculté de Médecine de Nantes auquel a été adjoint en 1990 le CNR pour la lysotypie et le typage moléculaire situé à l'Institut Pasteur.

Depuis juillet 1993, le Centre National de Référence des *Listeria* (CNRL) est hébergé à l'Institut Pasteur, initialement au sein du Laboratoire des *Listeria* puis depuis 2008 par le Groupe Microorganismes et Barrières de l'hôte devenu Unité de Biologie des Infections, Inserm U1117 en Janvier 2013. Il assure la surveillance microbiologique de la listériose en France. Son mandat de CNRL a été renouvelé par arrêté du 26 décembre 2011. L'Unité héberge également le Centre Collaborateur de l'OMS des *Listeria* (Mandat OMS renouvelé en Novembre 2011).

A.2. LES MISSIONS SPECIFIQUES DU CNRL

Les modalités de recrutement, les missions et le cahier des charges des CNR ont été fixés par l'arrêté du 29 Novembre 2004 (J.O n° 281 du 3 décembre 2004).

En termes d'expertises spécifiques dans son cahier des charges InVS pour le mandat 2012-2016, le CNRL doit :

- Typer en routine par une méthode discriminante basée sur le génotypage les souches humaines qui lui sont adressées ainsi que les souches alimentaires et/ou environnementales isolées lors d'investigations réalisées autour de cas de listériose humaine, 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, et contribuer au développement et à la validation de nouvelles méthodes diagnostiques utilisées en santé humaine.
- Etudier la sensibilité aux antibiotiques des souches isolées chez l'homme, et surveiller l'apparition de souches de sensibilité diminuée aux antibiotiques. Contribuer à l'étude des nouveaux mécanismes de résistance en collaboration avec le CNR de la résistance aux antibiotiques.
- Contribuer au développement des méthodes de typage et à la diffusion de ces techniques aux laboratoires d'analyse de biologie médicale.

En termes de surveillance, le CNRL doit :

- Surveiller toutes les souches issues d'infections humaines invasives ou non (GEA) de la manière la plus exhaustive possible, et détection des cas groupés.
- Etudier la sensibilité aux antibiotiques de ces souches isolées chez l'homme.
- Contribuer en liaison avec l'Institut de Veille Sanitaire à la surveillance épidémiologique nationale :
 - investigation notamment 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.
 - signalement à l'Institut de Veille Sanitaire 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.

- Collaborer avec les structures (laboratoires, Laboratoire National de Référence des *Listeria monocytogenes* (LNRI), ANSES-LSA etc.) travaillant en santé animale et sur les aliments (échange d'informations, de souches, etc.).
- 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.

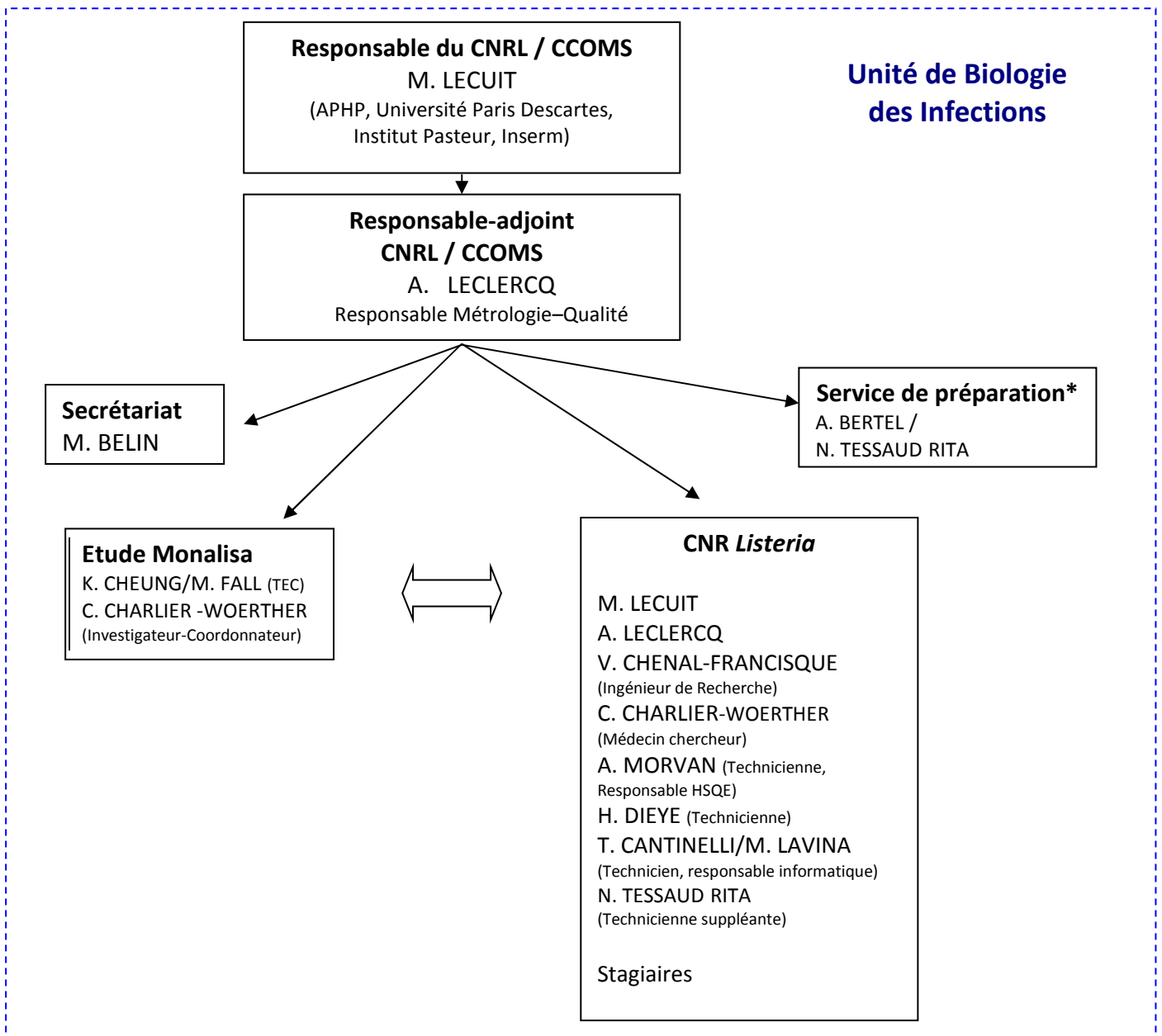
ANNEXE B : ORGANISATION DU CNR

B.1. PERSONNEL PERMANENT

Organigramme général et présentation

Il est présenté dans la figure 23.

Figure 23. Organigramme Général du Personnel du CNR *Listeria*.



Les effectifs

Ils sont présentés dans la Figure 23 et le Tableau 19.

Le responsable du CNRL est Marc Lecuit, professeur à l'Université Paris Descartes et praticien hospitalier à l'Hôpital Universitaire Necker Enfants malades, adjoint au chef du 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 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). Caroline Charlier-Woerther, Médecin chercheur, participe à l'expertise médicale.

Tableau 19. 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
Thomas Cantinelli / Morgane Lavina	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.

Thomas Cantinelli, technicien de laboratoire a quitté le laboratoire pour des raisons personnelles et a été remplacé par Morgane Lavina le 9 décembre 2013. Suite au déménagement du CNRL le 14 Octobre 2013, Arnaud Bertel, aide de laboratoire, a rejoint un autre service, car le laboratoire de préparation dans lequel il travaillait a été fermé.

Pour le reste de son activité, le personnel du CNR listé dans le Tableau 19 est financé par l'Institut Pasteur.

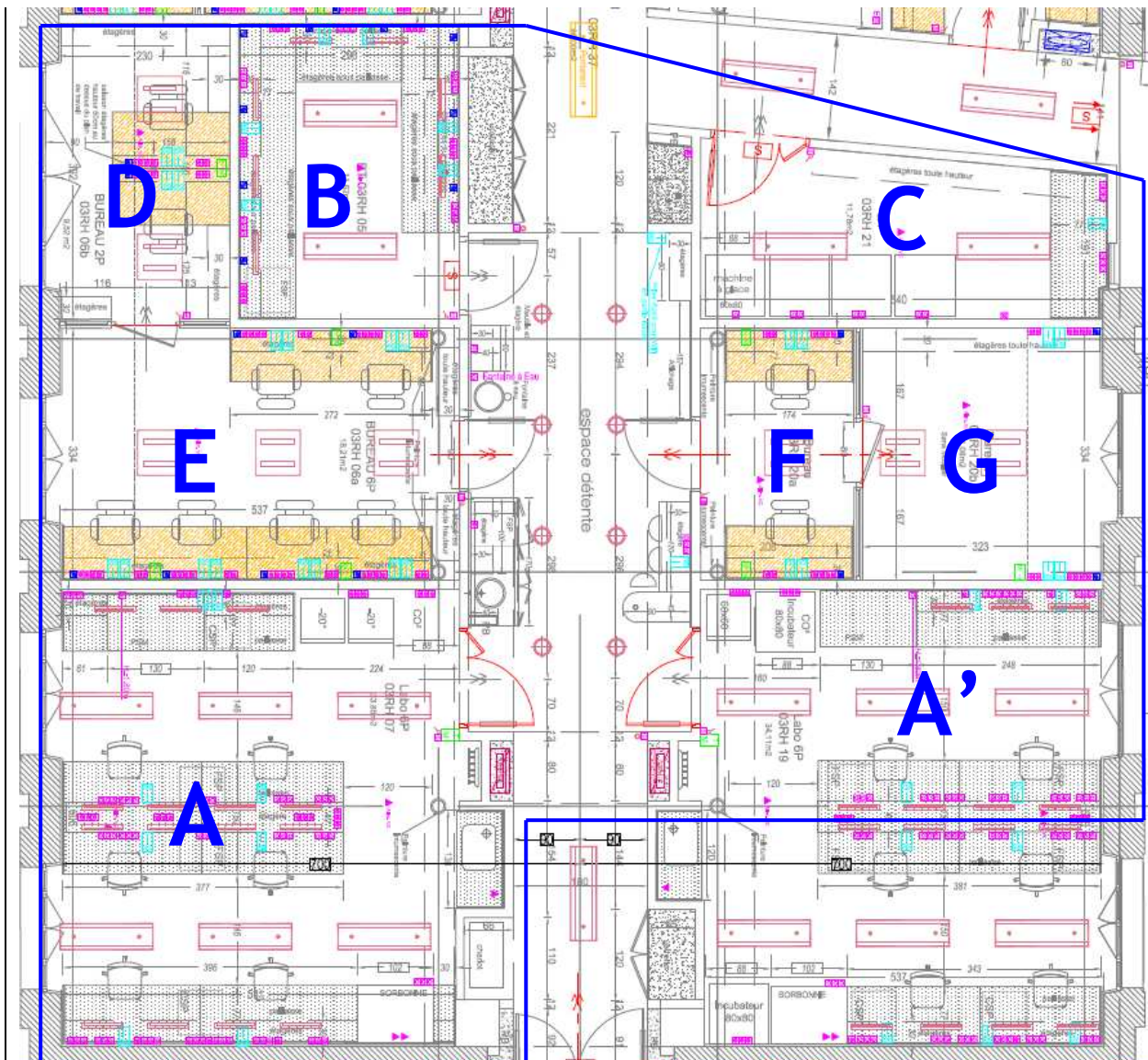
B.2. LOCAUX

Laboratoires et bureaux:

Le CNRL a déménagé le 14 octobre 2013 au sein de l'Institut Pasteur et est désormais hébergé dans des locaux entièrement rénovés, au rez-de-chaussée haut du bâtiment Duclaux, aile Fourneau de l'Institut Pasteur, 28 rue du Dr. Roux, 75015 Paris.

Les pièces décrites sur la Figure 25 hébergent le CNRL et le Centre collaborateur de l'OMS *Listeria* (CCOMS).

Figure 24. Plan des locaux du CNR des *Listeria*



Locaux du CNRL (Figure 24):

- 1 pièce laboratoire dédiée (A) et accès à un laboratoire de recherche (A')
- 1 pièce de PCR partagée (B)
- 1 pièce d'incubation partagée (C)
- 1 pièce de pesée partagée
- 1 chambre froide partagée

3 pièces de bureaux dédiées (D, E, F)
1 bibliothèque /salle de réunion /Archives partagées (G)
1 laverie / salle des autoclaves / salle de préparation partagées

B.3. EQUIPEMENT

L'ensemble des équipements scientifiques critiques pour les essais fait l'objet d'un suivi métrologique (Étalonnage-Cartographie et/ou vérification et d'un suivi continu des températures) ou d'une maintenance [10% de son budget de fonctionnement].

En 2013, l'Institut Pasteur a financé l'acquisition d'un appareil de prise de vue pour gel d'électrophorèse, un thermocycleur point final et une centrifugeuse de paillasse pour le CNRL.

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 centrifugeuse dont une pour les plaques,
- 3 équipements d'électrophorèse en champs pulsé partagés avec d'autres CNR,
- 3 thermocycleurs en point final,
- 2 générateurs et cuves d'électrophorèse,
- 1 fax-copieur.

Equipements partagés avec d'autres CNR

- 2 balances de pesée de précision
- 1 inoculateur multipoint partagé
- 1 système de prises de vues photographiques couplé à un ordinateur
- 1 machine à glace,
- 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

- Cellule d'Intervention Biologique d'Urgence : Accès à un appareil (site) de PCR en temps réel,
- Génopole,
- Animaleries de l'Institut Pasteur.

B.4. Mise en place de la démarche de management de la Qualité et hygiène/sécurité au sein du CNRL

Le CNRL est engagé depuis de nombreuses années dans une démarche qualité à laquelle participent tous les acteurs du laboratoire. Les modes opératoires sont suivis et mis à jour régulièrement pour accompagner les changements adoptés dans les domaines de notre expertise.

Le CNRL est engagé à une conformité par rapport au référentiel NF EN ISO 15189, qui nécessite une adaptation de son système qualité à ce nouveau référentiel et aux futurs documents de référence du COFRAC en santé humaine.

Intégration du CNRL dans le Laboratoire de Référence et d'Expertise Multi-Site (LREMS) et démarche qualité du LREMS: synthèse 2013

Historique :

En 1996, les Centres Nationaux de Référence (CNR) de l'Institut Pasteur ont entrepris une démarche qualité pour suivre le référentiel GBEA et, depuis 2008, dans le cadre des inspections ANSM, les exigences des arrêtés du 30 juillet 2004 et du 16 juillet 2007 liés aux Micro-Organismes et Toxines (MOT).

Le Service Qualité, Environnement et Développement Durable (QE-DD) apporte ses ressources et son expertise dans l'accompagnement du projet d'accréditation ISO 15189 des Laboratoires de Références et d'Expertise (CNR et CIBU) conformément à l'ordonnance du 13 janvier 2010 et à la loi du 31 mai 2013 relative aux activités de biologie médicale.

Projet ISO 15189 du LREMS de l'Institut Pasteur :

Bilan des actions réalisées en 2013 :

- Groupe de Travail Technique pour les validations de méthode (biologie moléculaire et sérologie) ;
- Formations : WebCampus, Manuel Qualité LREMS et Kalilab ;
- Audits internes techniques ISO 15189 pour les sites concernés par l'audit ISO 15189 ;
- Revue de direction LREMS ;
- Inclusion de la vague 2 (CNR Hantavirus, CNR FHV, **CNR *Listeria*** et CNR Méningocoques) dans la démarche d'accréditation ISO 15189.

Evènements d'importance en 2013 :

- Accréditation ISO 15189 du LREMS (CIBU, CNR Leptospirose, CNR coqueluche et autres bordetelloses, CNR Corynebactéries du complexe *Diphtheriae*, CNR Virus *Influenzae* et CNR Rage) par le COFRAC

Perspectives 2014 :

- Audits internes qualité et technique ISO 15189 : Mars 2014
- Revue de direction LREMS : 8 Avril 2014
- Poursuite du groupe de travail technique pour les validations de méthode : Juin et octobre 2013
- Finalisation dossiers de validation de méthode (1^{ère} et 2^{ème} vagues) : Juin 2014
- Audit de suivi ISO 15189 avec extension du périmètre (nouvelles techniques et nouveaux sites) : Novembre/décembre 2014

Programme concernant le CNR des *Listeria* faisant partie de la 2ème vague d'accréditation

1. Audit interne qualité et technique ISO 15189 du LRE-MS : Avril 2013
2. Revue de direction LRE-MS : 26 Avril 2013
3. Audit initial COFRAC : octobre 2013
4. Groupe de travail technique LRE-MS 2ème vague, n° 1 : Juin 2013

5. Groupe de travail technique LRE-MS 1ère vague, n° 3 : Octobre 2013
6. Finalisation dossiers validation de méthodes (1ère et 2ème vagues) : Décembre 2013
7. Revues qualité LRE-MS du CNR *Listeria* : 06 Mars 2014
8. Revue de direction LRE-MS : 8 Avril 2014
9. Audit interne CNR *Listeria* : Avril 2014
10. Finalisation dossiers de validation de méthode (1ère et 2ème vagues) : Juin 2014
11. Audit COFRAC LRE-MS dont CNR *Listeria* (*Méthodes Identification phénotypique et Groupage PCR*) : octobre 2014
12. Extension de la portée d'accréditation (Méthodes PFGE *Ascl/Apal* et antibiogramme) : 2015
13. Extension de la portée d'accréditation (Méthodes Sérotypage classique et MLST) : 2016

Le calendrier des méthodes demandées à l'accréditation a été réalisé en tenant compte de la possibilité que le séquençage de génome rend caduque des méthodes classiques.

Essais d'intercomparaison (EQA) de l'ECDC

Le CNRL participe à l'essai d'intercomparaison (EQA) entre les CNR européens organisés par le Statens Serum Institute (Danemark) pour l'ECDC. Deux campagnes de CILs ont eu lieu en 2013 sur le sérotypage classique, le géosérotypage et la PFGE avec les enzymes *Ascl/Apal*. Le CNR *Listeria* a obtenu les résultats présentés dans le Tableau 20 ainsi que les certificats attenants de réussite pour les 2 EQA.

Tableau 20. Résultats aux essais d'intercomparaison (EQA) du CNR des *Listeria*

Campagne EQA (Date)	EQA N° 1 (Mai 2013)	EQA N° 2 * (Décembre 2013)
Nombre de laboratoires participants	18	18
Identification <i>Lm</i>	100%	100%
Scores sérotypage classique	100%	90%**
Scores sérotypage moléculaire	100%	100%
Qualité Gel PFGE	<i>Ascl</i>	79%
	<i>Apal</i>	90%
Analyse gel PFGE Bionumerics	95%	95%
Appréciation globale sérotypage	Serotyping (both traditional and molecular) is correct for all 10 tested strains resulting in a perfect 100% score.	Serotyping is correct for all 10 tested strains in the molecular serotyping and 9 strains in the conventional.
Appréciation globale PFGE	Very good quality of gel and only minor comments.	Good quality of gel and BioNumerics and only minor comments

*, réalisé la semaine du déménagement du CNRL en conditions dégradées

**, souche sérotypable avec les sera antifacteurs du CCOMS, mais non avec les sera antifacteurs commerciaux, qui a fait considéré par les organisateurs de l'essai que la souche n'était pas sérotypable. Une réclamation est en cours auprès du SSI.

Hygiène/Sécurité

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.

ANNEXE C : ACTIVITES D'EXPERTISE DU CNR *LISTERIA*

C.1. IDENTIFICATION ET CARACTERISATION DES SOUCHES DE *L. MONOCYTOGENES* : METHODES ET MARQUEURS EPIDEMIOLOGIQUES DISPONIBLES

Les souches reçues 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. Les souches atypiques ou rendues non *Listeria* spp. sont soumises à une identification moléculaire par séquençage sur environ 1400 pb du gène codant les ARNr 16S et du gène *iap* (MLSA (MultiLocus Sequence Analysis) d'identification).

- **Détermination du sérotype PCR** selon la méthode publiée par le CNRL par M. Doumith (15) en 2004 et amendé par A. Leclercq (36) en 2010. Elle 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 *Lm* permettant de déterminer le « sérotype PCR ». Cette PCR multiplex peut être effectuée directement sur la culture sur gélose nutritive de la souche envoyée par le correspondant.

Le CNR continue de détenir l'ensemble des souches de référence O et H commerciales et de référence OMS pour réaliser sur demande le sérotypage classique des *Listeria* spp.

- **Analyse des profils de macrorestriction d'ADN génomique** (PFGE : électrophorèse en champ 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 (26) et modifié en 2013. 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 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.

A ce stade un numéro de nomenclature est attribué à chaque souche.

La nomenclature actuelle (définie en 2010 et modifiée en 2012) est la suivante : 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* et éventuellement *SmaI*, quand il a été déterminé. Par exemple, la souche M-Ilc-301006/301006 /B est une souche de *Listeria monocytogenes* de groupe PCR Ilc de profil PFGE *Ascl* 301006, de profil PFGE *Apal* 301006 et de profil *SmaI* B.

Un dictionnaire entre les profils PFGE et les allèles MLST a été établi en 2013 et la correspondance établie à chaque surveillance hebdomadaire.

- **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. Les souches résistantes aux antibiotiques sont transférées au CNR de la Résistance aux Antibiotiques pour confirmation et étude approfondie du mécanisme de résistance.

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 *Lm* 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 génétique des souches.** Sur la base du schéma MLST que le CNRL a établi, les souches d'intérêt de *Lm* 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.

- **Etude de la troncation de la protéine InIA** par séquençage et IFI pour estimer la virulence de la souche et sa capacité à traverser la barrière intestinale.

C.2. Techniques développées ou à l'étude en 2013

Méthodes en développement

Multi-virulence-locus sequence typing (MvLST)

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

En collaboration avec Sylvain Brisse, Unité de génomique évolutive des microbes, Institut Pasteur.

Publication : Cantinelli, T., V. Chenal-Francisque, L. Diancourt, L. Frezal, A. Leclercq, T. Wirth, M. Lecuit, and S. Brisse. 2013. "Epidemic Clones" of *Listeria monocytogenes* Are Widespread and Ancient Clonal Groups. J Clin Microbiol. 51(1):3770-9.

Le typage par MLST est la méthode de référence pour définir les groupes génétiques clonaux ou complexes clonaux (CC) dans de nombreuses espèces bactériennes. MLST met en jeu des gènes de ménage moins soumis à la pression de sélection que les gènes de virulence utilisés par la méthode MvLST utilisée pour définir les clones épidémiques (EC). L'objectif de cette étude était de comparer le jeu de gènes utilisé en MLST à celui du MvLST quant à la diversité génétique de *Lm*. Nous voulions aussi déterminer la position phylogénique des souches de référence des clones épidémiques dans le cadre du schéma MLST et estimer la diversité apportée par l'analyse par PFGE au sein des groupes clonaux et des clones épidémiques. Cette étude a été réalisée sur 125 isolats de *Lm* d'origine géographique et temporelle variée.

L'analyse PFGE a révélé une hétérogénéité dans les complexes majeurs. Nous avons montré que les schémas MLST et MvLST génèrent des groupes clonaux concordants et que la désignation actuelle des clones épidémiques par MvLST est redondante avec la nomenclature MLST. La définition de CC par MLST apparaît cependant plus appropriée en termes de répartition des groupes génétiques dans le temps et dans l'espace.

Séquençage du génome complet d'isolats de *L. monocytogenes*

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

En collaboration avec Sylvain Brisse, Unité de génomique évolutive des microbes, Institut Pasteur.

Le séquençage de génomes complets d'isolats représentatifs des souches cliniques et alimentaires est en cours. Leur annotation et la comparaison de ces génomes permettront de mieux comprendre la biodiversité de *Listeria*, d'identifier des génotypes éventuellement associés à l'hypervirulence et/ou l'hypovirulence, et de développer des outils d'analyse et de typage qui pourront être intégrés à la surveillance épidémiologique et microbiologique de la listériose.

Méthodes en cours de validation

Evaluation des kits de sérodiagnostic 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.

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 mis en place l'étude MONALISA afin, notamment, de recueillir les échantillons biologiques issus de patients avec listériose invasive et de patients témoins, et constituer une bibliothèque permettant d'évaluer ces outils diagnostiques dans un second temps, si un financement spécifique peut être obtenu.

C.3. MAINTIEN, DETENTION ET DIFFUSION DE MATERIEL BIOLOGIQUE

Les souches bactériennes et les collections

Il existe 8 catégories de souches envoyées au CNRL :

1. **souches humaines** : souches cliniques
2. **alerte sanitaire** : souches d'origine alimentaire ou issues de l'environnement de ces aliments, isolées dans le cadre d'investigation de cas groupés ou épidémiques et lors d'enquêtes ponctuelles autour d'un cas à la demande de l'InVS, de la DGS, de la DGAL ou de la DGCCRF.
3. **alerte-produit** : souches d'origine alimentaire ou issues de l'environnement de ces aliments isolées dans le cadre de contrôles officiels ou autocontrôles faisant l'objet d'une alerte DGAL avec saisie, ou retrait, ou rappel de produit. Ces « alertes-produits » correspondent soit à des non-conformités aux critères réglementaires fixés pour les aliments (présence de *L. monocytogenes* ou dépassement du seuil de 100 *L. monocytogenes*/g-ml), soit 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.). Ces interlocuteurs peuvent exiger la confidentialité de l'information transmise vis-à-vis des autorités sanitaires, ce qui limite l'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 large banque de souches (associées à une banque de données scientifiques et clinico-biologiques) très importante, véritable Centre de Ressource Biologique, utile dans le cas d'une investigation d'un clone épidémique pour identifier son origine géographique, temporelle ou sa source.

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 sérums de sérotypie non commercialisés.

Les collections de souches du CNRL/CCOMS sont les suivantes :

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

Le CNRL dispose des souches types complètement caractérisées 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* subsp. *fleischmannii*, *L. fleischmannii* subsp. *colorendiensis*) 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 d'environ 1.500 souches caractérisées par phénotypie, génosérotypage, PFGE, et, pour certaines, MLST et génome. Une base de données Excel regroupe l'ensemble des données sur ces souches.

Cette collection, majoritairement française, mais également internationale (CCOMS) comportait environ 101.984 souches à la fin de l'année 2013. Ces souches sont d'origine clinique, alimentaire et environnementale, ainsi que vétérinaire ou de recherche. Environ 60.800 souches de cette collection proviennent du CNRL. Elles sont conservées en gélose profonde dans des pièces à température contrôlée. Les souches d'origine humaine sont conservées à -80°C en tube de cryobilles dans un congélateur sous alarme. Le CNRL conserve également des 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 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, mais majoritairement France et Allemagne. Une base de données regroupe l'ensemble des données sur ces souches. Certaines sont actuellement utilisées dans le cadre de projets de recherche sur l'évolution et la biodiversité de *Listeria* (27, 28). Ces souches ont été caractérisées phénotypiquement et sont conservées en gélose profonde dans des pièces à température contrôlée.

Collection ILSI North America

Il s'agit de la collection du Technical Committee on Food Microbiology of ILSI North America contenant 43 isolats complètement caractérisés : 25 souches représentant la diversité des *Lm* et 18 souches d'épidémies, mises à disposition du CCOMS. Elles sont utilisables pour évaluer et valider des méthodes d'analyse ou de typage moléculaire et réaliser des essais de microbiologie prévisionnelle ou de croissance/survie. Elles sont conservées à -80°C en tube de cryobilles dans un congélateur sous alarme.

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 (certifiée AFAQ EN ISO 9001) 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, de référence, types, etc.) ainsi que les souches de référence de taxonomie et de sérotypie. Des souches du genre *Listeria* et de l'espèce *monocytogenes* ayant des

propriétés originales sont régulièrement mises en collection. La liste de ces souches est consultable à l'adresse web : http://catalogue.crbip.pasteur.fr/crbip_catalogue/faces/recherche_catalogue.xhtml et elles sont disponibles moyennant une somme couvrant les frais d'envoi et de maintien en collection sous assurance qualité.

Les sérums

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. Le CNRL détient également l'ensemble des sera Denka Seiken commerciaux de sérotypage des *Lm*.

Les bactériophages

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 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 telle que le phage P100 ayant obtenu l'autorisation GRAS (Generally Recognized As Safe) par la FDA aux USA.

C.4. DIFFUSION ET ECHANGE DE MATERIEL BIOLOGIQUE

Outre des souches, 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.

En 2013, le CNRL a envoyé 6 souches de la collection du CNRL :

- 1 souche *Lm* résistante aux fluoroquinolones à l'université Catholique de Porto (Portugal) ;
- 1 souche *Lm* d'un patient anglais ayant séjourné en France au public Health England, Gastrointestinal pathogens Reference Unit de Londres (UK) ;
- 1 souche *Lm* ST193 à l'Université Technique du Danemark (DTU, Copenhague) ;
- 1 souche alimentaire d'alerte produit à un laboratoire correspondant français dans le cadre d'une étude de challenge test pour son client ;
- 2 souches *Lm* alimentaires à un laboratoire correspondant français dans le cadre d'une étude de challenge test.

En 2013, le CNR a réceptionné 156 souches *Lm*:

- 41 souches *Lm* pour une étude sur les sérotypes et les déterminants antigéniques (M. Loessner, institut Fédéral Suisse de Technologie, Zurich, Suisse) ;
- 49 souches *Lm* pour une étude sur la MLST et sur les génomes (J. Haase, l'Université Collège de Cork, Irlande) ;
- 13 souches *Lm* pour une étude de caractérisation de souches (R. Mioni, Istituto Zooprofilattico sperimentale delle venezie, Italie) ;
- 39 souches *Lm* pour une étude sur la contamination de la viande de volaille et des résistances atypiques aux antibiotiques de référence (L. Bouayad, l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alger, Algérie) ;
- 1 souche *Lm* d'un patient français hospitalisé en Belgique (S. Bertrand, CNR Belge, ISP, Bruxelles) ;
- 2 souches *Lm* de patients anglais pour réaliser la PFGE puisque le CNR Anglais ne la réalise plus (C. Amar, Gastrointestinal Bacteria Reference Unit, Public Health England, Londres) ;
- 1 souche d'un LABM italien pour réaliser la PFGE ;
- 10 souches dans le cadre de l'essai d'intercomparaison des CNRL (EQA) en Mars et Octobre 2013 de l'ECDC (Statens Serum institute, Copenhague).

Conditions de mise à 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 exigé 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 donne éventuellement lieu à une contrepartie financière.

Maintien et curation de bases de données

Suite à la publication d'une méthode MLST (11, 44), l'Institut Pasteur a mis en place une base de données de *Multilocus Sequence Typing* (MLST) ouverte et accessible en ligne à la communauté scientifique <http://www2.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/> afin de favoriser les échanges et les collaborations internationales sur l'étude de la structure génétique des populations de *Listeria*. Plusieurs groupes (USA, Europe) utilisent cette base de données et des travaux collaboratifs dans le domaine de l'étude de la structure génétique des populations de *Listeria* sont en cours. Deux personnels du CNRL ont participé en 2013 à la curation de cette base.

C.5. TECHNIQUES RECOMMANDEES PAR LE CNRL

En microbiologie clinique

Le CNRL recommande de suivre les recommandations de l'European Manual of Clinical Microbiology / REMIC européen, chapitre *Listeria* (2).

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.

- *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) ou la galerie *MICROBACT 12L* (Oxoid) ainsi que le *Vitek 2* (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*.

L'identification par MALDI-TOF est correcte au genre, mais que cette méthode ne permet pas une bonne identification à l'espèce.

- *Sérotypage*

Le CNRL ne recommande pas aux laboratoires de 1^{ère} 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 ou non avec 5% de sang et 20 mg/L de β -Nicotinamide adénine dinucléotide (NAD).

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 contenues 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 24 suivant d'interprétation des résultats d'antibiogrammes. Les figures 26 à 29 présentent les différents résultats du CNRL pour les antibiogrammes des souches humaines de 2013 envers les antibiotiques : Amoxicilline, Ampicilline, Gentamicine, Triméthoprime.

Tableau 24. 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 $\mu\text{g/ml}$		
	Seuil de sensibilité	Valeurs intermédiaires	Seuil de résistance
Ampicilline**	≤ 1	-	> 1
Amoxicilline*	≤ 4	$> 4 - \leq 16$	≥ 16
Gentamicine*	≤ 4	8	≥ 16
Ciprofloxacine*	≤ 1	2	≥ 4
Chloramphénicol*	≤ 8	16	≥ 32
Streptomycine*	≤ 8	$> 8 - \leq 16$	> 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 utilisant 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 décrit dans le REMIC (Sérodiagnostic de la listériose, chapitre 37) sont pas pris en compte dans la surveillance nationale (2).

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

- La méthode développée par le service de microbiologie à l'Hôpital Necker-Enfants Malades qui repose sur la réalisation 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 (18). 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 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* (35).

En microbiologie vétérinaire

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

En microbiologie des aliments

Conformément aux règlements européens EC 2073/2005 modifiés, 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* -

Les méthodes alternatives validées selon l'EN ISO 16140 par AFNOR certification et par Microval (Tableaux 24 et 25) sont actualisées et 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*, le CNRL recommande l'utilisation de la galerie API LISTERIA (bioMérieux) ainsi que le Vitek 2 (bioMérieux) et comme alternative la galerie MICROBACT 12L (Oxoid), il 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).

Techniques transférées vers d'autres laboratoires

Le CNRL a publié les méthodes de typage MvLST et MLVA, qui peuvent être transférées à tout laboratoire souhaitant utiliser ces techniques.

Gestion, protection et sauvegarde de la base de données du CNRL

L'ensemble des données épidémioclinico-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 (norme NF EN ISO 15189 d'accréditation des laboratoires d'analyses de biologie médicale et de l'ASIP Santé (Agence des Systèmes d'Information Partagés de Santé)). 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 et une meilleure traçabilité. Les principaux axes de développement à effectuer sont : développement d'un module d'envoi d'un accusé de réception des envois aux laboratoires expéditeurs, 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 défini 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 cependant toujours des comparaisons à l'œil nu pour interpréter certains résultats et lui permet d'attribuer avec fiabilité un numéro de nomenclature, en conformité avec son cahier des charges.

Management de la qualité : Kalilab® et WebCampus

Le CNRL utilise un logiciel de management de la qualité à Kalilab® pour 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.