

# **I**NTERET DU TYPAGE DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* DANS LA SURVEILLANCE EPIDEMIOLOGIQUE DE LA LISTERIOSE HUMAINE EN FRANCE \*

Jocelyne ROCOURT [1] et Ch. JACQUET [1]

## **R**ESUME

La surveillance de la listériose en France repose sur deux structures, le Réseau national de santé publique (R.N.S.P.) et les Centres nationaux de référence (C.N.R.). Le rôle des C.N.R. est : l'évaluation de l'incidence annuelle, la détection de bouffée épidémique ou de véritable épidémie, et ceci à partir des souches adressées par les biologistes.

Pour ce faire, le C.N.R. de l'Institut Pasteur utilise des méthodes de typage phénotypique et moléculaire dont l'intérêt a été démontré lors de l'épidémie de France en 1992.

## **S**UMMARY

The surveillance of Listeriosis in France is realized through two institutions : Public Health National Network and Reference National Centers (RNC).

The aim of the RNC is : evaluation of annual incidence, detection of outbreaks and of real epidemics, all from the strains sent by biologists. To do that, the Institut Pasteur RNC uses phenotypical and molecular typing methods. During the French epidemic of 1992 they showed their value.

## I - INTRODUCTION

La surveillance épidémiologique des maladies transmissibles est assurée en France par diverses structures aux missions variées et complémentaires [20].

Pour la listériose, une surveillance régulière est assurée par le Réseau national de santé publique (R.N.S.P.) et les Centres nationaux de référence (C.N.R.). Le biologiste a un rôle central et essentiel dans la mesure où seul l'isolement de *L.*

*monocytogenes* à partir d'un prélèvement pathologique permet le diagnostic de listériose (en effet, d'une part sur le plan clinique, aucune symptomatologie n'est pathognomonique de cette infection, d'autre part, aucune méthode de référence n'est reconnue pour le sérodiagnostic). Après diagnostic bactériologique, le biologiste informe par voie télématique le R.N.S.P. du cas et envoie la souche aux C.N.R. pour caractérisation.

\* Texte de l'exposé présenté le 13 mai 1993

[1] Centre National de Référence pour la lysotypie et le typage moléculaire des *Listeria* et Centre Collaborateur de l'O.M.S. pour la listériose d'origine alimentaire, Institut Pasteur, 28 rue du Dr Roux, 75724 Paris cedex 15, France

## II - ROLE DES C.N.R. DANS LA SURVEILLANCE DE LA LISTERIOSE

Deux C.N.R. participent à la surveillance de la listériose : le C.N.R. des *Listeria*, localisé à la Faculté de médecine de Nantes (Pr A.L. Courtieu) qui assure la sérotypie des souches, et celui de l'Institut Pasteur qui assure la lysotypie et le typage moléculaire. Un échange hebdomadaire de souches et d'informations entre les deux laboratoires permet une surveillance régulière de cette infection [19].

En matière de listériose, le rôle majeur des C.N.R., en France comme dans les pays disposant de structures analogues, est d'évaluer l'incidence annuelle, de détecter une épidémie dès son émergence et de participer aux études consacrées à la transmission alimentaire de cette infection.

## III - METHODES DE TYPAGE DE *L. monocytogenes*

### A - METHODES DE TYPAGE PHENOTYPIQUE

Pendant de nombreuses décennies, la caractérisation des souches de *L. monocytogenes* a été limitée à la sérotypie [38]. En raison de la difficulté de la méthode, celle-ci n'est généralement assurée qu'à raison d'un laboratoire par pays. Basée sur l'étude de la structure antigénique qui comprend pour cette bactérie 15 antigènes somatiques et 5 antigènes flagellaires dont les associations définissent 13 sérovars, cette caractérisation est internationalement utilisée et reconnue. Particulièrement utile pour une première approche, elle est toutefois limitée par un faible pouvoir discriminant dans la mesure où seulement trois sérovars sont essentiellement rencontrés chez l'Homme : 1/2a, 1/2b et 4b.

Chez l'Homme, l'analyse des sérovars montre que le sérovar 4b est très souvent prédominant en France, représentant annuellement entre 50 et 65 % des cas. Une répartition similaire est également observée dans de nombreux pays d'Europe, mais une légère prédominance du sérovar 1/2 est en revanche notée sur le continent Nord-américain [31, 33]. Il convient d'ajouter que, exception faite des épidémies de Halle en 1966-1967, toutes les autres épidémies majeures de listériose ont été causées par des souches sérovar 4b [3, 8, 13, 17, 25, 37].

La distribution des sérovars est en revanche très différente pour les souches isolées d'aliments où les souches du sérovar 1/2 (1/2a, 1/2b et même 1/2c) représentent la majeure partie des souches isolées [10, 12, 36] et cette observation

est valable pour de très nombreux pays. En dépit d'une telle répartition, aucune relation entre la virulence et le sérovar n'a pu être mise en évidence [5].

Afin de subdiviser les souches d'un même sérovar, un système de lysotypie, basé sur l'utilisation de 26 phages de lysogénie, a progressivement été mis au point depuis une quinzaine d'années [1, 32]. Afin d'assurer la stabilité du système, cette méthode n'est pratiquée que dans 6 laboratoires dans le monde. La lysotypie a été particulièrement utile dans l'investigation des épidémies, en montrant que la plupart des souches isolées chez l'Homme en période épidémique appartenait au même sérovar, ce qui suggérait une source commune de contamination. Et ceci fut observé et démontré lors des épidémies du Canada en 1981 [37], de Boston en 1983 [13], de Californie en 1985 [25], de Suisse en 1983-1987 [3], de Grande-Bretagne en 1988-1989 [27] et plus récemment en France l'année dernière [17].

### B - METHODES DE TYPAGE MOLECULAIRE

Si les méthodes phénotypiques sont tout à fait appropriées au screening, il convient en revanche de caractériser plus finement les souches isolées lors de situations épidémiologiques particulières. Au fur et à mesure de leur description, les méthodes de typage moléculaire ont été immédiatement appliquées à *L. monocytogenes* en raison des problèmes épidémiologiques posés par la listériose.

Les principales méthodes utilisées sont basées :

### 1. SUR LA CARACTERISATION DES PROTEINES

Il s'agit essentiellement de l'analyse des profils d'isoenzymes mise au point dès 1989 [2, 30]. Sur la base des travaux publiés, cette méthode met en évidence deux groupes, l'un constitué par les souches sérovar 4b et 1/2b, l'autre par les souches 1/2a et 1/2c. Une subdivision très fine à l'intérieur de ces deux grands groupes permet de définir au moins 45 électrophorétypes pour *L. monocytogenes* [30].

### 2. SUR LA CARACTERISATION DE L'ADN

- Ribotypage : deux sondes ont été utilisées pour *L. monocytogenes* (pBA2 constituée des gènes codant pour l'ARNr de *Bacillus subtilis* [21], et pKK3535 constituée des gènes codant pour l'ARNr de *Escherichia coli* [18, 29]). Avec pBA2, deux groupes émergent au sein de *L. monocytogenes*, l'un regroupe 89 % de souches du sérovar 4b et 64 % de souches humaines, tandis que l'autre rassemble 48 % de souches du sérovar 1/2 et 42 % de souches isolées d'aliments ou de leur environnement [21]. Là encore, aucune relation entre la virulence et le ribovar n'a pu être mise en évidence [5].
- Profils de restriction d'ADN avec des enzymes engendrant de nombreux fragments de restriction et séparation de ces fragments par électrophorèse conventionnelle : cette méthode, appliquée notamment aux souches des épidémies de Suisse et du Canada, a confirmé dans un cas comme dans l'autre l'identité des souches isolées durant une même épidémie [28].

- Profils de restriction d'ADN avec des enzymes engendrant peu de fragments de restriction et séparation de ces fragments de haut poids moléculaire par électrophorèse en champ pulsé : dans l'état actuel des résultats publiés, cette méthode apparaît comme la plus discriminante. L'utilisation de trois enzymes, *Apal*, *SmaI* et *NotI*, permet de définir plus de 70 combinaisons au sein de *L. monocytogenes* [4, 6, 7].
- RAPD ("Random Amplification Polymorphic DNA") : nouvellement décrite, cette méthode apparaît prometteuse pour le gain notable de temps que l'utilisation de la PCR apporte [26].

### C - COMPARAISON DES METHODES

Les méthodes utilisées pour le typage de *L. monocytogenes* étant utilisées dans de nombreux pays, et leur nombre augmentant régulièrement depuis l'introduction des méthodes moléculaires, une étude multicentrique internationale a été entreprise sur l'initiative de l'O.M.S. afin d'évaluer ces méthodes, de proposer une standardisation de leur protocole et enfin définir une nomenclature des variétés observées pour chacune d'entre elles. Cette étape d'"homogénéisation" s'impose en effet face à la diversité méthodologique qui s'est progressivement installée depuis environ 5 ans.

Il convient d'ajouter que si les méthodes de typage phénotypique sont rapides, simples et peu coûteuses, en revanche les méthodes de typage moléculaire nécessitent en général un matériel plus sophistiqué, sont plus longues et plus onéreuses.

## IV - ROLE DE LA MICROBIOLOGIE DANS LA SURVEILLANCE DE LA LISTERIOSE : EXEMPLE DE L'EPIDEMIE DE FRANCE EN 1992

La surveillance de la listériose nécessite l'étude de plusieurs centaines de souches chaque année. Face à un tel nombre, le microbiologiste a besoin de méthodes simples, rapides, peu onéreuses et assez discriminantes, caractéristiques auxquelles répondent la sérotypie et la lysotypie. En revanche, face à une situation épidémiologique particulière, qu'il s'agisse d'un cas sporadique

d'origine alimentaire, d'une contamination nosocomiale ou encore d'une épidémie, il est désormais nécessaire d'utiliser au moins un typage moléculaire afin de confirmer les résultats phénotypiques et de caractériser plus complètement les souches.

Cette hiérarchie dans le choix des méthodes fut particulièrement illustrée lors de l'étude de l'épidémie de 1992 en France [34]. La surveillance des souches isolées de patients par sérotypie et lysotypie a permis en mai de détecter une augmentation du nombre de cas causés par une souche sérovar 4b et lysovar 2389/2425/3274/2671/47/108/340 et d'alerter la D.G.S. (Direction Générale de la Santé) et le R.N.S.P. [23, 24]. Un dispositif d'investigations très complet basé sur une enquête cas-témoin, la recherche de *Listeria* dans les aliments prélevés dans le réfrigérateur des patients et dans les magasins où les patients avaient l'habitude de s'approvisionner ainsi que le renforcement des contrôles dans l'ensemble des industries agro-alimentaires a été immédiatement mis en place [14, 15, 24].

Le C.N.R. de l'Institut Pasteur a reçu en conséquence plus de 15.000 souches en 7 mois.

Le screening en vue de rechercher la souche épidémique a été réalisé avec le sérogroupage et la lysotypie, seule méthode permettant d'assurer à moindre frais et dans un délai de 48 heures cette détection pour un nombre aussi important de souches. Toutefois, si cette méthode était satisfaisante pour un screening, l'étude des souches épidémiques a été parallèlement poursuivie par la détermination des pulsovars [4]. La caractérisation de 278 souches humaines a montré que 89 % des souches appartiennent à la même combinaison de profils confirmant l'émergence brutale d'une souche responsable de l'épidémie. La même étude faite sur les souches d'origine alimentaire a permis d'identifier avec précision les aliments contaminés par ce clone. Le ribotypage [21] effectué sur 20 souches épidémiques confirme également l'identité de ces souches.

## V - CONCLUSION

Le système de surveillance basé sur l'étude des souches adressées aux C.N.R. par les biologistes ne permet certes pas un recensement exhaustif des cas (811 cas recensés auprès des biologistes en 1986 contre 335 souches reçues au C.N.R. la même année) [9, 16]. Toutefois, ce système est assez sensible pour détecter les phénomènes anormaux et en assurer ensuite leur maîtrise comme cela fut récemment démontré lors de l'épidémie de 1992 en France.

Les méthodes de typage bactérien ont certes beaucoup évolué durant les cinq dernières années avec l'introduction du typage moléculaire, mais il n'en demeure pas moins que les méthodes phénotypiques conservent une grande actualité,

permettant à un laboratoire de pouvoir faire face sans délai au typage d'un grand nombre de souches lors d'une situation épidémique exceptionnelle.

La surveillance de la listériose basée sur le typage des souches d'origine humaine a permis d'accumuler depuis quelques années un ensemble d'informations complètes et variées en ce qui concerne l'épidémiologie de cette infection chez l'Homme, qu'il s'agisse de l'incidence annuelle [9, 12, 36], l'analyse de bouffées épidémiques [22, 35] ou encore d'une épidémie [17, 24, 33]. Il est dommage en revanche que l'épidémiologie de la listériose animale ne fasse pas l'objet d'études similaires.

## VI - REFERENCES CITEES

1. AUDURIER A., ROCOURT J. et COURTIEU A.L.- Isolement et caractérisation de bactériophages de *Listeria monocytogenes*. Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur), 1977, 128A, 185-198.
2. BIBB, W.F., GELLIN B.G., WEAVER R., SCHWARTZ B., PLIKAYTIS B.D., REEVES M.W., PINNER R.W. and BROOME C.V.- Analysis of clinical and food-borne isolates of *Listeria monocytogenes* in the United States by multilocus enzyme electrophoresis and application of the method to epidemiologic investigations. Appl. Environ. Microbiol., 1990, 56, 2133-2141
3. BILLE J.- Anatomy of a foodborne listeriosis outbreak. In : Foodborne Listeriosis (Proceedings of a Symposium on September 7, 1988 in Wiesbaden, FRG) B. Behr's GmbH & Co, Hamburg, 1989, pp 29-36.
4. BROSCH R., BUCHRIESER C. and ROCOURT J.- Subtyping of *Listeria monocytogenes* Serovar-4b by Use of low-Frequency-Cleavage Restriction Endonucleases and Pulsed-Field Gel Electrophoresis. Res. Microbiol., 1991, 142, 667-675.
5. BROSCH R., CATMEL B., MILON G., BUCHRISER C., VINDEL E. and ROCOURT J.- Virulence heterogeneity of *Listeria monocytogenes* strains from various sources (food, human, animal) in immunocompetent mice and its association with typing characteristics. J. Food. Protect. (sous presse).
6. BUCHRIESER C., BROSCH R. and ROCOURT J.- Use of pulsed field gel electrophoresis to compare large DNA-restriction fragments of *Listeria monocytogenes* strains belonging to serogroups 1/2 and 3. Int. J. System. Microbiol., 1991, 14, 297-304.
7. BUCHRIESER C., BROSCH R., CATIMEL B. and ROCOURT J.- A new view of human listeriosis epidemiology : pulsed-field gel electrophoresis applied for comparing *Listeria monocytogenes* strains involved in outbreaks. Canad. J. Microbiol. (sous presse).
8. CARBONNELLE B., COTTIN J., PARVERY F., CHAMBREUIL G., KOUYOUMDJIAN S., LE LIRZIN M., CORDIER G. et VINCENT F.- Epidémie de listériose dans l'Ouest de la France (1975-1976). Rev. Epidém. Santé Publ., 1978, 26, 451-467.
9. ESPAZE E.P. et COURTIEU A.L.- Rapport du Centre National de Référence des *Listeria*, 1986. Bull. Epidém. Hebd., 1987, 39, 153-155.
10. ESPAZE E.P., ROCOURT J. et COURTEU A.L.- La listériose en France en 1987. Etude à partir des souches adressées au Centre National de Référence. Bull. Epidémiol. Hebd., 1989, 12, 46-47.
11. ESPAZE E.P., ROCOURT J. et COURTIEU A.L.- La listériose en France en 1988. Etude à partir des souches adressées au Centre National de Référence. Bull. Epidémiol. Hebd., 1990, 1, 1-2.
12. ESPAZE E.P., ROCOURT J. et COURTIEUX A.L.- La listériose en France en 1989. Etude à partir des souches adressées au Centre National de Référence. Bull. Epidémiol. Hebd., 1991, 3, 9-10.
13. FLEMING D.W., COCHI S.L., MACDONALD K.L., BRONDUM J., HAYES P.S., PLIKAYTIS B.D., HOLMES M.B., AUDURIER A., BROOME C.V. and REINGOLD A.L.- Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. New Engl. J. Med., 1985, 312, 404-407.
14. Epidémie de Listériose en France (Situation au 13 août 1992).- Bull. Epidémiol. Hebd., 1992, 33, 163.
15. Epidémie de Listériose en France (Situation au 10 septembre 1992).- Bull. Epidémiol. Hebd., 1992, 38, 181-182.
16. GOULET V. et BROHIER S.- La listériose en France en 1986. Recensement auprès de laboratoires hospitaliers. Path. Biol., 1989, 37, 206-211.

17. GOULET V., LEPOUTRE A., ROCOURT J., COURTIEU A.L., DEHAUMONT P. et VEIT P.- Epidémie de listériose en France. Bilan final et résultats de l'enquête épidémiologique. Bull. Epidémiol. Hebd., 1993, 4, 13-14.
18. GRAVES L.M., SWAMINATHAN B., REEVES M.W. and WENGER J.- Ribosomal DNA fingerprinting of *Listeria monocytogenes* using a dioxigenin-labelled DNA probe. Eur. J. Epidemiol., 1991, 7, 7-82.
19. HUBERT B.- Les Centres Nationaux de Référence. Une place importante dans la surveillance des maladies transmissibles. Rev. Prat. Md. Gn., 1990, 115, 2557-2562.
20. HUBERT B., LAPORTE A., LEPOUTRE A., ROURE C., BRUNET J.B., GOULET V., REBIERE I., GARNERIN P., VALLERON A.J., JESTIN C. et BOUVET E.- La surveillance des maladies transmissibles en France. Bull. Epidémiol. Hebd., 1991, 36, 155-157.
21. JACQUET CH., BILLE J. and ROCOURT J.- Typing of *Listeria monocytogenes* by restriction polymorphism of the ribosomal ribonucleic acid gene region. Zbl. Bakt., 1992, 276, 356-365.
22. LEMAGNY F., REBIERE I., ROCOURT J. et HUBERT B.- Listériose humaine : enquête épidémiologique de deux épisodes épidémiques en France, en 1988 et 1989. Bull. Epidémiol. Hebd., 1989, 39, 162-163.
23. LEPOUTRE A., MOYSE C., ROURE C., ROCOURT J., GOULET V. et COURTIEU A.L.- Epidémie de listériose en France. Bull. Epidémiol. Hebd., 1992, 25, 115.
24. LEPOUTRE-TOULEMON A., ROCOURT J., GOULET V. et COURTIEU A.L.- L'épidémie de listériose en France. Situation au 8 octobre 1992. Méd. Mal. Infect., 1992, 22, 35-40.
25. LINNAN M.J., MASCOLA L., LOU X.D., GOULET V., MAY S., SALMINEN C., HIRD D.W., YONEKURA M.L., HAYES P., WEAVER R., AUDURIER A., PLIKAYTIS B.D., FANNIN S.L., KLEKS A. and BROOME C.V.- Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese. New Engl. J. Med., 1988, 319, 823-828.
26. MAZURIER S.I. and WERNARS K.- Typing of *Listeria* strains by Random Amplification of Polymorphic DNA. Research in Microbiology, June 1992, 143 (5), 499-505.
27. McLAUCHLIN J., HALL S.M., VELANI S.K. and GILBERT R.J.- Human Listeriosis and Pate - A possible Association. British Medical Journal ; September 28, 1991, 303 (6805), 773-705.
28. NOCERA D., BANNERMAN E., ROCOURT J., JATON-OGAY K. and BILLE J.- Characterization by DNA restriction endonuclease analysis of *Listeria monocytogenes* strains related to the Swiss epidemic of listeriosis. J. Clin. Microbiol., 1990, 28, 2259-2263.
29. NOCERA D., ALTWEGG M., MARTINETTI LUCCHINI G., BANNERMAN E., ISCHER F., ROCOURT J. and BILLE J.- Characterization of *Listeria* strains from a foodborne listeriosis outbreak by rDNA gene restriction patterns compared to four other typing methods. Eur. J. Microbiol. Infect. Dis., 1993 (sous presse).
30. PIFFARETTI J.C., KRESSENBUCH H., AESCHBACHER M., BILLE J., BANNERMAN E., MUSSER J.M., SELANDER R.K. and ROCOURT J.- Genetic characterization of clones of the bacterium *Listeria monocytogenes* causing epidemic disease. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 1989, 86, 3818-3822.
31. ROCOURT J.- Human listeriosis - 1989. WHO/HPP/FOS/91.3.
32. ROCOURT J., AUDURIER A., COURTIEU A.L., DURST J., ORTEL S., SCHRETTENBRUNNER A. and TAYLOR A.G.- A multi-centre study on the phage typing of *Listeria monocytogenes*. Zbl. Bakt. Hyg. A, 1985, 259, 489-497.
33. ROCOURT J. and BROSCHE R.- Human listeriosis - 1990. WHO/HPP/FOS/92.4.
34. ROCOURT J., CATIMEL B., JACQUET CH., BUCHRIESER C. et BROSCHE R.- Epidémie de listériose - Apport de la microbiologie. Méd. Mal. Infect., 1992, 22, 31-34.
35. ROCOURT J., ESPAZE E.P., MINCK R., CATIMEL B., HUBERT B. and COURTIEU A.L.- Cluster of listeriosis isolates with different serovar and phagovar characteristics. Lancet, 1989, 334, 217-1218.

36. ROCOURT J., ESPAZE E.P., MIEGEVILLE A.F., CATIMEL B. et COURTIEU A.L.- La listériose en France en 1990 - Etude à partir des souches adressées au Centre National de Référence. Bull. Epidémiol. Hebd., 1992, 16, 69-70.
37. SCHLECH III W.F., LAVIGNE P.M., BORTOLUSSI R.A., ALLEN A.C., HALDANE E.V., WORT A.J., HIGHTOWER A.W., JOHNSON S.E., KING S.H., NICHOLLS E.S. and BROOME C.V.- Epidemic listeriosis - Evidence for transmission by food. New Engl. J. Med., 1983, 308, 203-206.
38. SEELIGER H.P.R. and KOHNE K.- Serotyping of *Listeria monocytogenes* and related species. in : Methods in Microbiology (Bergan, T. and Norris, J., ed.), 1979 ; Academic Press, New York, 33-48.

\*  
\* \*