

# Nouvelles approches diagnostiques dans la listériose humaine\*

J-L. GAILLARD\*\*, Y. GHOLIZADEH\*\* et B. PRON\*\*

**RESUME** Deux nouvelles approches sont actuellement proposées pour le diagnostic de la listériose humaine. Leur principale indication est la listériose neuro-méningée de l'adulte. La première approche est l'amplification génique par la *polymerase chain reaction* à partir d'échantillons de liquide céphalo-rachidien (LCR). Le seuil de détection atteint avec les techniques publiées est de 200 unités formant colonies par ml de LCR. La seconde approche est le sérodiagnostic par détection des anticorps anti-listériolysine O. Elle permet un diagnostic indirect des listérioses neuro-méningées avec culture négative du sang et du LCR. La valeur de ces méthodes doit être précisée par des études prospectives contrôlées.

**Mots-clés :** Listériose - *Listeria monocytogenes* - Polymerase chain reaction - Sérodiagnostic - Anticorps anti-listériolysine O.

Le diagnostic de listériose repose, en pratique courante, sur l'isolement de *Listeria monocytogenes* à partir de prélèvements provenant de sites normalement stériles comme le sang, le liquide céphalo-rachidien (LCR) ou le liquide amniotique. La plupart des auteurs s'accordent pour reconnaître les insuffisances de cette approche, en particulier dans les listérioses neuro-méningées (1, 2, 3, 4). Deux nouvelles méthodes diagnostiques ont été récemment proposées. La première est l'amplification génique par la *polymerase chain reaction* (PCR) à partir d'échantillons de LCR (5, 6). La seconde est le sérodiagnostic par détection des anticorps anti-listériolysine O (ALLO) (7).

## LA PCR

### PCR et *Listeria*

Les grandes épidémies de listérioses survenues ces dernières années ont conduit les professionnels de l'industrie alimentaire à promouvoir le développement de techniques plus rapides et plus

sensibles que les techniques bactériologiques traditionnelles, pour la détection de *L. monocytogenes* dans les aliments. Plusieurs travaux ont ainsi été consacrés à l'amplification génique par PCR appliquée à *L. monocytogenes* (5, 8, 9, 10, 11). Différentes séquences nucléotidiques spécifiques de cette espèce ont été proposées, appartenant au gène codant pour l'ARN ribosomal 16S (ARNr 16S) ou à des gènes de virulence comme les gènes *iap* (codant pour la protéine p60) et *hly* (codant pour la listériolysine O). Ces séquences sont utilisées comme cibles d'amplification et/ou comme sondes de détection.

Une approche originale de type PCR "universelle" visant à détecter les principaux pathogènes méningés, dont *L. monocytogenes*, a été publiée très récemment (12). Elle consiste en une amplification

\* Colloque Bellon, Paris, 17 mars 1995, sur "*Listeria monocytogenes* et sa pathologie".

\*\* Laboratoire de Microbiologie, Hôpital Necker-Enfants Malades, 149 rue de Sèvres - F-75743 Paris Cedex 15.

d'une région conservée du gène ARNr 16S à l'aide d'un couple d'amorces dites universelles, suivie d'une détection par une sonde oligonucléotidique interne spécifique d'une des espèces ou groupes bactériens suivants : *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli* et autres entérobactéries, *Staphylococcus aureus* et *L. monocytogenes*. Cette méthode, séduisante dans son principe, n'a pas encore été évaluée à partir d'échantillons cliniques.

### PCR et listériose

Chez l'homme, la "PCR *Listeria*" a été exclusivement appliquée au diagnostic des formes neuro-méningées de la listériose. Le premier travail publié a utilisé des LCR d'origine humaine artificiellement contaminés par *L. monocytogenes* (5). Les échantillons, lysés par sonication, étaient soumis à une PCR amplifiant un fragment de 606 paires de bases (pb) du gène *hly*. La limite de détection obtenue après simple migration en gel d'agarose suivie d'une révélation par le bromure d'éthidium était de 10<sup>5</sup> unités formant colonies (UFC)/ml.

Jaton et coll., dans un travail rétrospectif, ont étudié des échantillons de LCR prélevés lors de listérioses neuro-méningées bactériologiquement documentées (6). Deux protocoles ont été préalablement évalués *in vitro* : après une première PCR, les amplifiats étaient soit détectés à l'aide d'une sonde froide intragénique en *dot-blot*, soit réamplifiés à l'aide d'amorces internes (*nested-PCR*); dans ce dernier cas, l'ADN amplifié était visualisé après migration en gel d'agarose et coloration par le bromure d'éthidium. Deux couples d'amorces étaient employés, permettant l'amplification de fragments du gène *iap* d'une taille de 468 et 287 pb. La sensibilité des deux méthodes s'est avérée comparable, avec un seuil de détection de 200 UFC/ml.

Plus simple et virtuellement moins sujette à d'éventuelles contaminations, la "PCR *dot-blot*" a été choisie pour l'étude des LCR. Les résultats obtenus ont été les suivants. Sur 17 échantillons de LCR positifs en culture pour *L. monocytogenes*, 14 ont été trouvés positifs en PCR; en ce qui concerne les 3 faux-négatifs, la culture de *L. monocytogenes* avait été peu abondante et tardive, ou l'échantillon n'était qu'un surnageant recueilli

après centrifugation. Sur 7 échantillons de LCR prélevés lors de ponctions lombaires de contrôle au cours du traitement de listérioses neuro-méningées, et restés stériles en culture, 3 ont été trouvés positifs en PCR. Cependant, un fort pourcentage de faux-positifs était enregistré lors de ce travail. Sur 14 échantillons de LCR prélevés au cours de méningites dues à d'autres germes, 4 étaient positifs en PCR, soit près de 30 % de faux-positifs. Ces faux-positifs étaient attribués à des contaminations, non pas au cours de la PCR, mais au moment de la collecte des LCR au laboratoire, qui avait eu lieu au moment de l'épidémie de listériose (Suisse).

## LE SERODIAGNOSTIC PAR DETECTION DES ALLO

### Les tests pratiqués

Jusqu'à ces dernières années, le diagnostic sérologique des listérioses avait été très décevant. La méthode classique par agglutination utilisait des suspensions d'antigènes bactériens dits somatiques et flagellaires, préparées à partir des deux principaux sérovars de *L. monocytogenes*. Elle était tout à la fois peu spécifique, du fait de l'existence d'antigènes communs entre *L. monocytogenes* et d'autres bactéries à Gram positif, et peu sensible (13). Les autres tests proposés (réaction de fixation du complément, immuno-précipitation, immuno-hémolyse passive), utilisant également des antigènes non caractérisés, présentaient les mêmes défauts (14, 15). La situation s'est radicalement transformée avec la mise au point de tests fondés sur la détection des anticorps dirigés contre la listériolysine O (7, 16), principal facteur de virulence de *L. monocytogenes* (17, 18). Ces tests ont fait la preuve de leur valeur en pathologie humaine (7) et vétérinaire (16), mais ne sont pas encore disponibles dans le commerce.

Notre laboratoire réalise en routine un test de type *dot-blot* utilisant comme antigène de la listériolysine O native, purifiée à partir de surnageants de culture de *L. monocytogenes* (7). C'est à ce jour le seul test à avoir été validé chez l'homme. La réalisation du test comporte un traitement préalable des sérums des patients, ayant pour but d'éliminer les anticorps anti-streptolysine O. La présence d'anticorps anti-streptolysine O, même à des titres faibles comme cela est le cas pour une part impor-

tante de la population générale, provoque en effet de fausses réactions positives dues à la parenté antigénique qui existe entre la listériolysine O et la streptolysine O. Le test pratiqué ne détecte que les IgG. Il est positif dans 50 % à 60 % des listérioses prouvées par culture du germe, en retenant comme significatif un titre de 200 ou plus (le titre est l'inverse de la plus forte dilution du sérum donnant encore une réaction visible sur le filtre de nitrocellulose). Très récemment, notre laboratoire a développé un test en Western-blot utilisant comme antigène un polypeptide produit par génie génétique, qui correspond aux 411 premiers acides aminés de la listériolysine O. Dépourvu de la partie présentant la plus forte homologie avec la streptolysine O, cet antigène permet une réaction en une seule étape, sans adsorption préalable des sérums (19).

### **Cinétique de production des ALLO**

Les données concernant la cinétique de production des ALLO au cours de la listériose humaine sont très imparfaites, puisque la date de contamination par *L. monocytogenes* n'est jamais connue avec précision. De notre expérience, il apparaît cependant que des IgG spécifiques sont détectables dès les premiers jours de la maladie clinique et persistent pendant 6 à 12 mois à des taux élevés. En revanche, nous n'avons jamais pu mettre en évidence de réponse significative de type IgM chez les patients que nous avons étudiés. L'infection expérimentale d'animaux comme le mouton a permis récemment d'analyser la cinétique de production des ALLO au cours de la listériose (20). Des IgG spécifiques peuvent être mis en évidence dès le 9<sup>e</sup> jour après l'administration des bactéries par voie orale, et présentent un taux maximal vers le 20<sup>e</sup> jour. Leur taux diminue ensuite très lentement. La production d'IgM est inconstante et transitoire, entre le 9<sup>e</sup> et le 20<sup>e</sup> jour.

### **Détection des ALLO dans la listériose neuro-méningée de l'adulte**

Les méningo-encéphalites et les encéphalites d'étiologie inconnue, avec culture du LCR et hémocultures négatives, sont actuellement les meilleures indications du sérodiagnostic (21). Il faut souligner que la recherche des ALLO s'effectue sur des échantillons de sérum. Elle est en effet sans intérêt dans le LCR, puisque les taux des ALLO de type IgG dans ce liquide ne font que

refléter les taux sanguins et qu'il n'existe pas de production intrathécale détectable d'ALLO de type IgM.

Nous avons rapporté récemment une série de 10 observations de listérioses neuro-méningées avec sang et LCR stériles, diagnostiquées uniquement par la mise en évidence d'une réponse significative vis-à-vis de la listériolysine O (22). Les tableaux réalisés étaient tout à fait comparables à ce que l'on peut observer au cours de listérioses neuro-méningées bactériologiquement documentées (3, 23). Étaient tout particulièrement remarquables : l'âge des patients ( $\geq 50$  ans dans 7 cas); la notion, dans 5 cas, d'un ou plusieurs facteurs de risque tels que éthyliisme, cirrhose, corticothérapie ou maladie de système; l'existence, dans 4 cas, d'une atteinte d'une ou plusieurs paires crâniennes; la constatation, dans tous les cas, d'une réponse favorable à l'administration d'une aminopénicilline, seule ou associée à un aminoside (tableau I).

Le sérodiagnostic par détection des ALLO a une valeur diagnostique indiscutable dans les listérioses neuro-méningées. Son intérêt est d'autant plus grand qu'il est très souvent positif dès les premiers jours d'hospitalisation. Ceci est très certainement dû au délai qui existe entre le début des signes cliniques et l'admission des patients à l'hôpital (en moyenne 10 jours, dans notre série). Cependant, il faut rappeler que la sensibilité de ce test, évaluée à partir de listérioses bactériologiquement documentées, n'est que de 50 à 60 %. Enfin, éventualité rare mais qui mérite d'être connue, ce test peut être faussement positif au cours d'encéphalites herpétiques. L'hypothèse la plus vraisemblable rendant compte de ces faux-positifs est celle de la réactivation d'une "cicatrice sérologique" anti-listériolysine O au cours de l'infection par le virus HSV1. Ce type de stimulation aspécifique, polyclonale, est bien documenté pour l'ensemble des virus du groupe des Herpès virus, même s'il est surtout connu pour le virus d'Espstein-Barr.

### **Détection des ALLO dans les autres formes de listériose**

Les listérioses materno-néonatales avec atteinte patente du fœtus ou de l'enfant s'accompagnent quasi-constamment d'une réponse anti-listérioly-

**TABLEAU I : Principales données cliniques concernant 10 observations de listériose neuro-méningée culture-négative diagnostiquée par la sérologie ALLO. Modifié de Y. Gholizadeh (22).**

Patients	Age/Sexe <sup>(a)</sup>	Facteurs favorisants	Présentation clinique <sup>(b)</sup>	Traitement initial	Evolution immédiate	Séquelles à distance
1	29 ans / M	non	ME (nc; hp)	aminopénicilline; aciclovir	progressivement favorable	syndrome cérébelleux et parésie des ceintures
2	39 ans / F	non	M	aminopénicilline	rapidement favorable	non
3	56 ans / F	corticothérapie	ME (nc)	aminopénicilline + aminoside	progressivement favorable	instabilité à la marche
4	62 ans / M	éthylisme	M	aminopénicilline + aminoside	favorable	non
5	50 ans / F	non	E (nc)	aminopénicilline	favorable	non
6	64 ans / M	cirrhose éthylique	ME (hp; cc)	aminopénicilline	favorable	non
7	26 ans / F	maladie de système	ME (cc)	aminopénicilline + aminoglycoside; aciclovir; antituberculeux	progressivement favorable	non
8	59 ans / M	cirrhose éthylique pancytopénie	ME (nc)	aminopénicilline	progressivement favorable	paralysie faciale droite
9	54 ans / M	?	ME (hp; cc)	aminopénicilline	favorable	?
10	73 ans / M	?	ME	?	favorable	non

(a) M : masculin, F : féminin.

(b) M : méningite; E : encéphalite; ME : méningo-encéphalite; nc : atteinte d'au moins un nerf crânien; hp : hémiparésie; cc : crise comitiale.

sine O chez la mère, témoignant de l'importance du foyer infectieux dans ces formes (7). Mais on attend surtout du sérodiagnostic qu'il démontre la responsabilité éventuelle de *L. monocytogenes* lorsqu'une femme enceinte présente un épisode fébrile. Les indications de la recherche des ALLO dans ce cadre particulier restent à définir. Nous n'avons jamais constaté de réponse sérologique évocatrice de listériose récente chez les femmes enceintes fébriles que nous avons étudiées. Ce résultat n'est pas surprenant. D'une part, la survenue d'une listériose est un événement peu fréquent. D'autre part, les patientes étaient traitées

par une aminopénicilline en même temps que le 1er sérum était prélevé et nous était adressé pour la recherche des ALLO. En tout état de cause, aucun cas de listériose ne nous a été signalé chez le fœtus ou l'enfant à la suite de l'épisode fébrile.

Il faut noter que l'interprétation des résultats du sérodiagnostic est parfois difficile pour des titres juste significatifs (200 en dot-blot). D'où l'intérêt de réaliser le test en parallèle sur un sérum prélevé en début de grossesse et conservé en sérothèque (sérothèque "toxoplasmose", par exemple). Enfin, nous avons été confrontés à des réponses sérolo-

giques faussement positives vis-à-vis de la listériolysine O, chez des femmes enceintes présentant une infection à cytomégalovirus. Il s'agit très certainement, là encore, d'une stimulation polyclonale dans le cadre des infections à virus du groupe Herpès.

Les formes bactériémiques de listériose sont le plus souvent séro-négatives (7). Ce fait n'est pas étonnant dans la mesure où, dans la plupart des cas, ces infections surviennent volontiers dans le contexte d'une immuno-dépression et ne s'accompagnent pas de foyer tissulaire patent. La recherche des ALLO a ainsi une valeur diagnostique très médiocre dans les épisodes fébriles isolés chez des sujets immunodéprimés. A l'inverse, ce test mérite d'être réalisé chez les patients présentant une bactériémie documentée à *L. monocytogenes* dans un but pronostique. La constatation d'un titre élevé en ALLO est en effet, dans ce cas, très évocatrice de l'existence d'un foyer infectieux passé inaperçu (endocardite, par exemple).

## CONCLUSION

Les listérioses neuro-méningées constituent le principal champ d'application des nouvelles méthodes diagnostiques que sont la PCR et le

sérodiagnostic par détection des ALLO. On attend de ces techniques qu'elles apportent un gain de sensibilité substantiel par rapport aux cultures bactériologiques traditionnelles. A ce jour, la PCR n'a pas répondu à cet objectif. Ce n'est pas seulement un problème de performance, même si des améliorations sont nécessaires en terme de sensibilité et de spécificité. Au cours des listérioses neuro-méningées, le LCR contient souvent peu ou pas de germes. En effet, l'infection intéresse initialement le parenchyme cérébral et ne se propage que secondairement et inconstamment aux méninges (1, 24, 25). Les méthodes d'amplification à partir d'échantillons de LCR, quelles qu'elles soient, connaîtront ainsi toujours des limites. Le sérodiagnostic par détection des ALLO ne connaît pas ce handicap. Il reste cependant à en améliorer la sensibilité et la praticabilité. Enfin, comme tout test sérologique, il ne permet qu'un diagnostic rétrospectif. En conclusion, si la PCR et la sérologie ALLO sont des approches séduisantes, leur valeur réelle mérite d'être précisée par des études prospectives contrôlées, dans des conditions normales d'utilisation.

### Remerciements :

Nous tenons à remercier Melle G. Heusdens pour la typographie du manuscrit.

## SUMMARY

Two new approaches have been proposed for diagnosis of human listeriosis. They aim principally to diagnose central nervous system (CNS) infections in adults. The first approach is the detection of *Listeria monocytogenes* DNA in cerebrospinal fluid (CSF) by means of polymerase chain reaction amplification. The detection limit with published procedures is  $10^2$  colony forming units/ml of CSF. The second approach is serodiagnosis based upon the detection of anti-listeriolysin O. This latter approach is suitable for diagnosing culture-negative listeriosis of CNS. Controlled prospective studies are needed in the future to evaluate these new methods.

**Key-words :** Listeriosis - *Listeria monocytogenes* - Polymerase chain reaction - Serodiagnosis - Anti-listeriolysin O.

## DIAGNOSIS OF HUMAN LISTERIOSIS : NEW APPROACHES

## REFERENCES

1. SEELIGER H.P.R. - Listeriosis. New York : Hafner Publishing Co., 1961.
2. GRAY M.L., KILLINGER A.H. - *Listeria monocytogenes* and listeric infections. Bacteriol Rev. 1966 ; 30 : 309-82.
3. NIEMAN R.E., LORBER B. - Listeriosis in adults : a changing pattern. Report of eight cases and review of the literature. Rev Infect Dis. 1980 ; 2 : 207-27.
4. GELLIN B.G., BROOME C.V. - Listeriosis. JAMA. 1989 ; 261 : 1313-20.
5. BESSESEN M.T., LUO Q., ROTBART H.A. et coll. -

- Detection of *Listeria monocytogenes* using the polymerase chain reaction. Appl Environ Microbiol. 1990 ; 56 : 2930-2.
6. JATON K., SAHLI R., BILLE J. - Development of polymerase chain reaction assays for detection of *Listeria monocytogenes* in clinical cerebrospinal fluid samples. J Clin Microbiol. 1992 ; 30 : 1931-6.
  7. BERCHE P., REICH K.A., BONNICHON M. et coll. - Detection of anti-listeriolysin O for serodiagnosis of human listeriosis. Lancet. 1990 ; 335 : 624-7.
  8. BORDER P.M., HOWARD J.J., PLASTOW G.S. et coll. - Detection of *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* using polymerase chain reaction. Lett Appl Microbiol. 1990 ; 11 : 158-62.
  9. FURRER B., CANDRIAN U., HOEFELEIN C. et coll. - Detection and identification of *Listeria monocytogenes* in cooked sausages products and in milk by *in vitro* amplification of hemolysin gene fragments. J Appl Bacteriol. 1991 ; 70 : 372-9.
  10. WERNARS K., HEUVELMAN C.J., CHAKRABORTY T. et coll. - Use of the polymerase chain reaction for direct detection of *Listeria monocytogenes* in soft cheese. J Appl Bacteriol. 1991 ; 70 : 121-6.
  11. WANG R.F., CAO W.W., JOHNSON M.G. - 16S rRNA-based probes and polymerase chain reaction method to detect *Listeria monocytogenes* cells added to foods. Appl Environ Microbiol. 1992 ; 58 : 2827-31.
  12. GREISEN K., LOEFFELHOLZ M., PUROHIT A. et coll. - PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid. J Clin Microbiol. 1994 ; 32 : 335-51.
  13. MOREL A., LEMELAN J.F., BOIRON H. - Intérêt de la séroagglutination dans le diagnostic de la listériose. Méd Mal Infect. 1978 ; 8 : 339-42.
  14. GIRARD K.F., SBARRA A.J., BARDAWIL W.A. - Serology of *Listeria monocytogenes*. J Bacteriol. 1963 ; 85 : 349-55.
  15. LARSEN S.A., JONES W.L. - Evaluation and standardization of an agglutination test for human listeriosis. Appl Microbiol. 1972 ; 24 : 101-7.
  16. LOW J.C., DAVIES R.C., DONACHIE W. - Purification of listeriolysin O and development of an immunoassay for diagnosis of listeric infections in sheep. J Clin Microbiol. 1992 ; 30 : 2705-8.
  17. GAILLARD J.-L., BERCHE P., MOUNIER J. et coll. - *In vitro* model of penetration and intracellular growth of *Listeria monocytogenes* in the human enterocyte-like cell Caco-2. Infect Immun. 1987 ; 55 : 2822-9.
  18. BIELECKI J., YOUNGMAN P., CONNELLY P. et coll. - *Bacillus subtilis* expressing a hemolysin gene from *Listeria monocytogenes* can grow in mammalian cells. Nature (London). 1990 ; 345 : 175-6.
  19. GHOLIZADEH Y. - Sérodiagnostic de la listériose par détection d'anticorps anti-listériolysine O : production d'antigènes spécifiques par génie génétique. Diplôme d'Etudes Approfondies. Universités Paris V et Paris XI. 1993.
  20. LHOPITAL S., MARLY J., PARDON P. et coll. - Kinetics of antibody production against listeriolysin O in sheep with listeriosis. J Clin Microbiol. 1993 ; 31 : 1537-40.
  21. GAILLARD J.-L., BERETTI J.-L., BOULOT-TOLLE M. et coll. - Serological evidence for culture-negative listeriosis of central nervous system. Lancet. 1992 ; 340 : 560.
  22. GHOLIZADEH Y. - Intérêt de la détection des anticorps anti-listériolysine O pour le diagnostic des listérioses neuro-méningées. Diplôme d'Etudes Spécialisées de Biologie Médicale. Université Paris. 1994.
  23. HUMBERT G., DUVAL C., FESSART C. et coll. - Les listérioses en France, résultats d'une enquête nationale (824 cas). Méd Mal Infect. 1976 ; 6 : 60-70.
  24. CORDY D.R., OSEBOLD J.W. - The neuropathogenesis of *Listeria monocytogenes* encephalomyelitis in sheep and mice. J Infect Dis. 1959 ; 104 : 164-73.
  25. BERCHE P. - Physiopathologie des infections neuro-méningées par *Listeria monocytogenes*. Méd Mal Infect. 1985 ; 10 : 588-92.

