



Focus sur un laboratoire

Le Laboratoire de référence de l'Union européenne pour l'*Escherichia coli* producteur de vérotoxine (VT) [VTEC], basé à l'Istituto Superiore di Sanità, à Rome

A. Caprioli, S. Morabito, G. Scavia, R. Tozzoli, C. Graziani, C. Ferreri, F. Minelli, M.L. Marziano, S. Babsa. Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italie

A. Caprioli, S. Morabito, G. Scavia, R. Tozzoli, C. Graziani, C. Ferreri, F. Minelli, M.L. Marziano, S. Babsa. (2010). Le Laboratoire de référence de l'Union européenne pour l'*Escherichia coli* producteur de vérotoxine (VT) [VTEC], basé à l'Istituto Superiore di Sanità, à Rome, EuroReference, No. 4, ER04-10F01. <http://www.anses.fr/euroreference/numero4/PN4001.htm>



L'Istituto Superiore di Sanità, à Rome, est, depuis 2006, le Laboratoire de référence de l'Union européenne pour *Escherichia coli*, y compris l'*E. coli* vérotoxigène (VTEC). Il est aussi le laboratoire national de référence (LNR) pour l'Italie et détient une certification UNI EN/ISO 17025. L'objectif principal de son mandat est d'assurer que les méthodes utilisées par les LNR des États membres pour l'identification et le typage des souches d'*E. coli*, comme les VTEC, sont normalisées, ainsi que les méthodes pour détecter ces pathogènes dans les échantillons de denrées alimentaires. Cet objectif est atteint par le développement de méthodes, la distribution de matériels de référence, l'organisation des essais inter-laboratoire d'aptitude, et l'accueil de chercheurs des LNR pour des stages de formation. Le Laboratoire de référence de l'Union européenne VTEC travaille avec d'autres institutions (EFSA, ECDC) pour mettre en place des programmes de suivi et de surveillance pour les VTEC.

Introduction

Les infections à *Escherichia coli* verotoxinogènes (VTEC) sont un problème majeur de santé publique, à cause des maladies graves qu'ils engendrent, telles que la colite hémorragique et le syndrome hémolytique et urémique (SHU), surtout chez les enfants et les personnes âgées (Caprioli *et al.*, 2005; Karmali *et al.*, 2003). Le grand nombre de foyers épidémiques à travers le monde souligne l'importance de ces agents pathogènes et met l'accent sur la nécessité de la déclaration obligatoire de la maladie ainsi que de la coopération entre laboratoires, à l'intérieur et à l'extérieur des états. Ainsi, dans la Directive 2003/99/CE (Annexe I, Partie A), qui établit le système européen de surveillance et de recueil de données sur les zoonoses, les infections à VTEC sont citées sur la liste des zoonoses prioritaires pour la mise en place de systèmes de surveillance. La Commission européenne (CE) a donc décidé de désigner un laboratoire de référence pour les VTEC et, à la suite d'un appel public à candidature, l'Istituto Superiore di Sanità (ISS) a reçu un mandat de 5 ans, qui a débuté le 1^{er} juillet 2006. L'Article 32 du règlement (CE) n° 882/2004 décrit les fonctions des laboratoires de référence pour les aliments pour animaux et les denrées alimentaires. En termes pratiques, cela demande: (1) de développer des méthodes de référence de détection, d'identification et de typage des VTEC; (2) de coordonner l'application de ces méthodes par les laboratoires nationaux de référence, notamment en organisant des essais inter-laboratoires d'aptitude; (3) de coordonner le réseau des LNR européens, en les informant des progrès dans le domaine, en leur fournissant des matériels de référence et en organisant des cours de formation spécifiques sur les méthodes d'analyse; et (4) de fournir une assistance technique et scientifique à la Commission, notamment à la Direction générale de la santé et des consommateurs (DG SANCO) et à l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA). La DG SANCO finance les activités du Laboratoire de référence de l'UE.

Le laboratoire est abrité par le Département de Santé publique vétérinaire et de protection des denrées alimentaires de l'Istituto Superiore di Sanità, et a un personnel qui comprend 5 chercheurs, 3 techniciens, 1 assistant de gestion technique et un doctorant. Il a été certifié à la norme internationale ISO/IEC 17025 par l'organisme d'accréditation italien (SINAL). Des installations spéciales sont consacrées aux différentes méthodes de détection et de typage, notamment les tests microbiologiques et sérologiques, la PCR conventionnelle et la PCR en temps réel, l'électrophorèse en champ pulsé, et le séquençage des gènes.

Coordination du réseau de LNR

Le Laboratoire de référence de l'UE dans le domaine des VTEC coordonne un réseau de 32 LNR pour *E. coli*, désignés par les 27 États membres. Les LNR désignés par les autorités compétentes de la Suisse, de la Norvège, de la Serbie, de la République de Macédoine, et de la Turquie sont aussi invités à participer au réseau. Des ateliers annuels sont organisés pour les LNR dans le but de: 1) fournir un aperçu de la surveillance et du suivi des activités concernant les infections à VTEC menées dans l'UE; 2) disséminer les informations sur les nouveaux outils diagnostiques, les résultats des recherches, et les recommandations du Laboratoire de référence de l'UE; 3) discuter des résultats des essais inter-laboratoire d'aptitude (EILA) qui ont été conduits; 4) procéder à un échange d'expériences avec des présentations sur les activités des LNR. Des représentants de la DG SANCO, de l'EFSA et du Centre européen de prévention et de contrôle des maladies (ECDC) participent régulièrement à ces ateliers. Le nombre de LNR participant aux ateliers est passé de 23 en 2006 à 30 en 2009. Le site web du laboratoire (www.iss.it/vtec) est également utilisé pour disséminer des informations au réseau de LNR.



Focus sur un laboratoire

Coopération avec d'autres laboratoires de référence

Le Laboratoire de référence de l'UE coopère activement avec le Centre international *Escherichia* et *Klebsiella* de l'OMS (dirigé par le docteur Flemming Scheutz), abrité par le Statens Serum Institut à Copenhague. Ce centre sert de laboratoire de référence pour les infections à VTEC pour le réseau des LNR européens dans le domaine médical, qui est coordonné par l'ECDC. L'objectif principal de cette coopération est de normaliser les schémas d'identification et de typage et les programmes externes d'assurance de qualité qui s'y rapportent, d'assurer que les programmes de surveillance et les bases de données respectives soient comparables pour les données humaines et vétérinaires.

Assistance aux LNR des États membres de l'UE et des pays tiers

Le laboratoire de l'*Istituto Superiore di Sanità* maintient et distribue des matériels de référence, comme des souches de



Figure 1. Chercheurs visiteurs.

référence d'*E. coli*, des extraits d'ADN et des antigènes pour les tests sérologiques. Notamment, des souches d'*E. coli* devant être utilisées comme contrôle positif pour les PCR faisant partie des tests de compétence ont été distribuées à tous les LNR. Des procédures normalisées d'opération (SOP) pour la détection, l'identification et le typage VTEC ont été rédigées et distribuées. Elles peuvent être consultées sur www.iss.it/vtec. Il accueille aussi du personnel des LNR et d'autres laboratoires pour des formations. À ce jour, 18 chercheurs venant de six LNR, de quatre universités et de quatre laboratoires de pays tiers (Chili, Croatie, Égypte, Nigéria) ont été accueillis pour des périodes allant d'une semaine à 4 mois. La figure 1 montre des chercheurs du LNR de Pologne et de l'Institut vétérinaire central de Croatie, pendant leur cours de formation.

Développement de méthodes et organisation des essais inter-laboratoires d'aptitude

Identification et typage des souches VTEC

La première condition en bactériologie des VTEC est d'être capable de distinguer les VTEC des *E. coli* commensaux non-pathogènes qui sont habituellement présents dans les échantillons de denrées alimentaires ou de matières fécales. Actuellement, l'approche principale est la détection des gènes codant pour la VT (vtx) par des techniques de PCR. L'étape suivante est le typage des souches isolées pour identifier les souches VTEC qui appartiennent à un nombre restreint de lignées clonales qui sont le plus souvent liées à des maladies humaines graves. Cela peut être effectué en identifiant le sérotype des souches par des méthodes sérologiques ou moléculaires, et en détectant des gènes de virulence supplémentaires, comme le gène *eae* codant pour l'intimine. Ainsi, le LCR VTEC a rédigé un SOP pour l'identification et le typage et a organisé 4 séries d'essais inter-laboratoires d'aptitude afin que tous les LNR soient finalement capables :

- d'identifier correctement une souche d'*E. coli* comme étant VTEC par détection par PCR des gènes de virulence ;

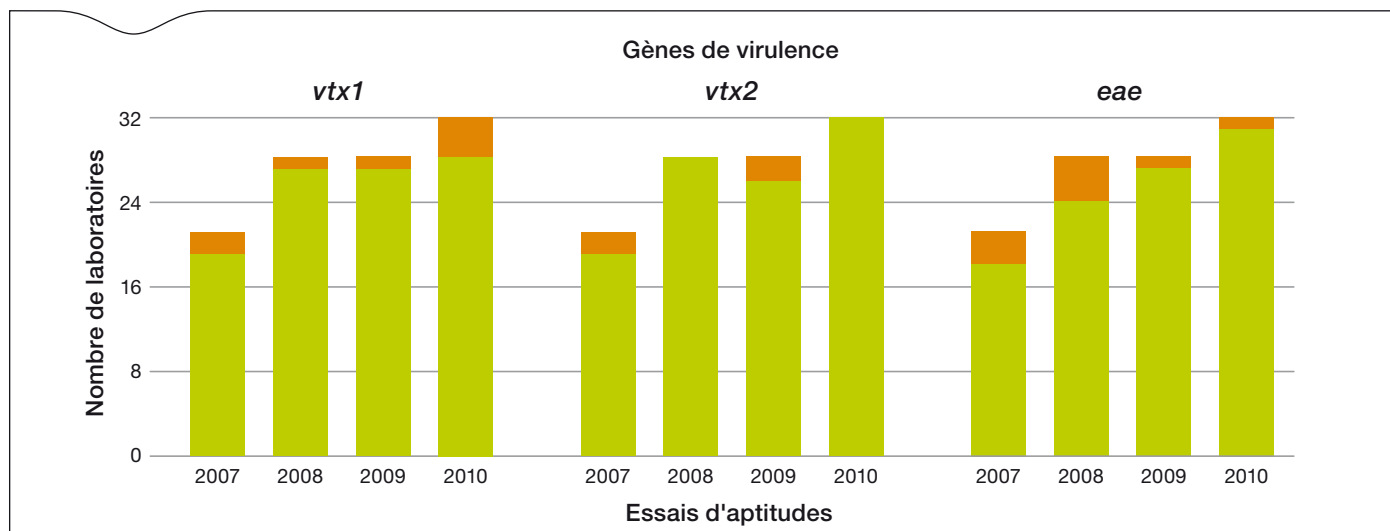


Figure 2. Essais inter-laboratoires d'aptitude organisés par le laboratoire de référence sur la détection par PCR des gènes de virulence dans les souches VTEC.

Pour chaque gène, les barres vertes représentent le nombre de LNR qui ont obtenu des résultats corrects pour toutes les souches du test.

Focus sur un laboratoire

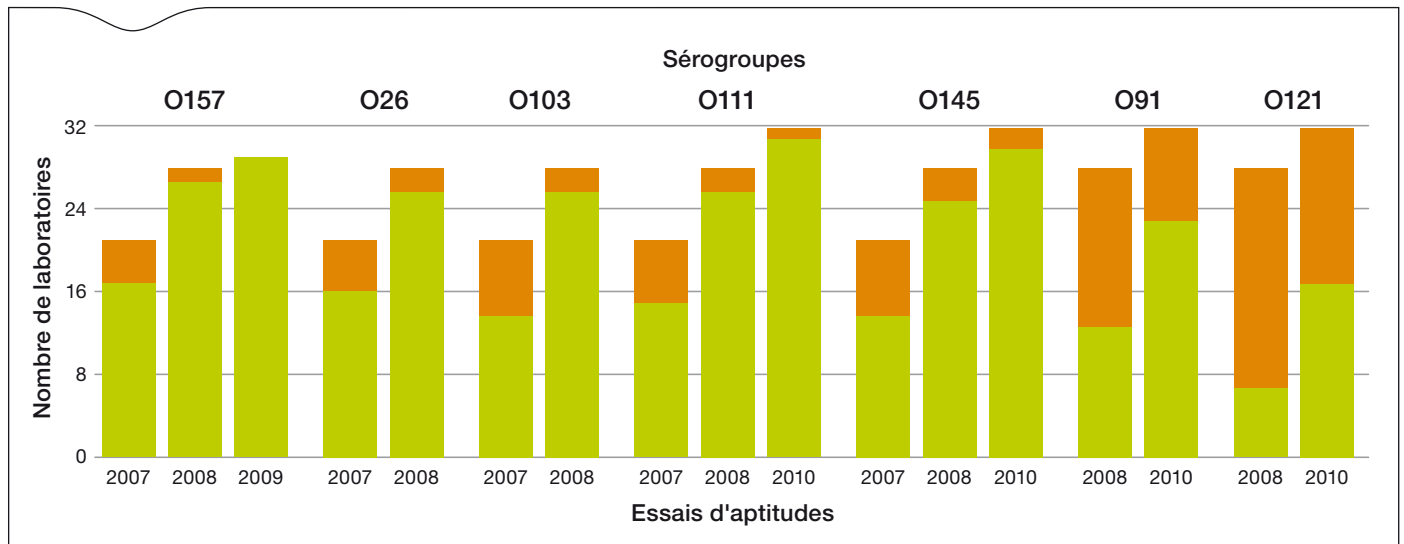


Figure 3. Essais inter-laboratoires d'aptitude organisés par le laboratoire de référence sur l'identification des sérogroupes VTEC les plus impliqués dans les maladies humaines en Europe. Pour chaque séro groupe, les barres bleues représentent le nombre de LNR qui ont correctement identifié le séro groupe. Les barres rouges indiquent les LNR qui ont obtenu des résultats incorrects ou n'ont pas effectué le test.

- d'identifier correctement *E. coli* O157 et les sérogroupes non-O157 des VTEC qui sont surtout liés aux maladies humaines graves, selon les données recueillies et publiées par l'ECDC (EFSA-ECDC, 2010).

Le nombre de LNR présents aux essais inter-laboratoires d'aptitude est en augmentation. Les résultats des laboratoires ayant participé aux différents essais, sur la détection de gènes de virulence (figure 2) et sur le sérotypage des souches (figure 3), ont, depuis, connu une amélioration. En particulier, il est important de noter que tous les LNR sont maintenant capables d'identifier correctement les souches VTEC appartenant au séro groupe O157, et la plupart des souches appartenant aux 4 autres sérogroupes qui sont surtout impliqués dans les infections humaines : O26, O103, O111, O145.

Détection des VTEC dans les échantillons de denrées alimentaires

En 2007, comme des méthodes normalisées n'étaient disponibles que pour le VTEC O157, le Comité européen de normalisation (CEN) (Comité technique 275 – Analyse des produits alimentaires – Méthodes horizontales, Groupe de travail 6 – Contamination microbienne) désigna le Laboratoire de référence de l'UE VTEC comme le coordinateur d'un groupe de travail *ad hoc* chargé de développer une méthode horizontale normalisée par PCR en temps réel pour la détection des sérogroupes VTEC les plus impliqués dans les infections humaines graves. Depuis, le groupe de travail a développé une méthode qui est maintenant publiée comme une spécification technique ISO-CEN appelée « Méthode horizontale pour la détection d'*Escherichia coli* produisant des Shiga-toxines (STEC) appartenant aux sérogroupes O157, O111, O26, O103, et O145 – Méthode qualitative » (ISO-TS 13136). La méthode cible aussi bien les gènes de virulence (*vtx1* et *vtx2*, et *eae*) que les gènes spécifiques de séro groupe, et peut être utilisée pour le dépistage des échantillons. Les échantillons qui sont positifs en même temps pour *vtx*, *eae*, et les gènes spécifiques

de séro groupe, sont soumis à une étape supplémentaire afin d'isoler la souche VTEC responsable des réactions de PCR positives.

La méthode a été recommandée par l'EFSA pour la détection des VTEC non-O157 dans les échantillons de denrées alimentaires dans le cadre des programmes de surveillance (EFSA, 2009) et, après discussion avec les LNR, le laboratoire de l'*Istituto Superiore di Sanità* a organisé 3 séries de tests de compétences sur son utilisation (figure 4). Comme la méthode est basée sur l'utilisation de la RT-PCR, qui est la technologie de pointe, la première série a été conduite sur une gamme de souches VTEC, afin de permettre aux laboratoires de se familiariser avec l'approche de dépistage moléculaire. Seize LNR ont participé à l'étude, et 10 ont correctement identifié tous les gènes chez toutes les souches. Les deux séries suivantes portaient sur des supports contaminés nécessitant la mise en œuvre de la méthode complète de détection. La deuxième série portait sur la détection des VTEC O157 et non-O157 sur des écouvillonnages de carcasses. Seize LNR ont participé à l'étude : 14 ont réalisé correctement l'étape de dépistage par RT-PCR et 13 ont aussi réussi l'étape d'isolement. La troisième série portait sur la détection de VTEC non-O157 dans le lait. Vingt-neuf LNR ont participé à l'étude : 25 ont réalisé correctement l'étape de dépistage par PCR et 24 ont aussi réussi l'étape d'isolement.



Focus sur un laboratoire

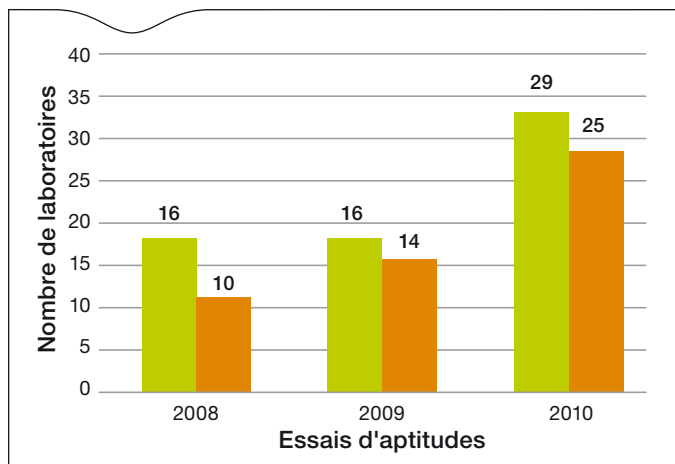


Figure 4. Essais inter-laboratoires d'aptitude organisés par le laboratoire de référence sur la détection des sérogroupes VTEC les plus impliqués dans les maladies humaines, utilisant les spécifications techniques ISO-CEN par PCR en temps réel, tel que recommandé par l'EFSA (EFSA, 2009).

Les barres bleues représentent le nombre de LNR qui ont participé à chaque test de compétence et les barres vertes le nombre de LNR qui ont correctement détecté tous les gènes cibles de la méthode.

Détection de VTEC O157 dans des échantillons d'origine animale

Il n'y a pas encore de méthode ISO pour la détection de VTEC O157:H7 dans les échantillons d'origine animale. Cependant, la méthode ISO 16654:2001 pour la détection dans les produits d'alimentation animale et les denrées alimentaires, basée sur la séparation immuno-magnétique spécifique après une étape d'enrichissement, a été adaptée pour l'analyse des matières fécales animales dans beaucoup d'études et a été recommandée par l'EFSA pour la détection de VTEC O157 dans les échantillons d'origine animale dans le cadre des programmes de surveillance (EFSA, 2009). Ainsi, le laboratoire a organisé des essais inter-laboratoires d'aptitude sur son utilisation pour l'isolement de VTEC O157 à partir d'écouvillonnages de carcasses. Vingt-neuf LNR ont participé à l'étude et 27 ont identifié correctement l'absence ou la présence de VTEC O157 dans les échantillons.

Conclusions

Une grande variété de VTEC peut être retrouvée dans les populations d'animaux produisant des denrées alimentaires (Caprioli *et al.*, 2005), mais un nombre limité de sérotypes pathogènes a été lié de façon régulière à des infections humaines (Karmali *et al.*, 2003; EFSA, 2007; EFSA-ECDC, 2010). Le développement de méthodes spécifiques de détection pour les types les plus pathogènes représente un défi majeur qui nécessitera un réseau de laboratoires compétents et bien formés à travers l'UE pour leur détection dans les vecteurs d'infection. Le Laboratoire de référence de l'UE dans le domaine des VTEC s'efforce de consolider un tel réseau, afin: (1) d'augmenter les connaissances sur l'épidémiologie des infections à VTEC en Europe; (2) de recueillir des données normalisées sur la prévalence de ces agents pathogènes dans les échantillons de denrées alimentaires, finalisées selon la définition des critères microbiologiques pour les VTEC; (3) de fournir à la CE des structures opérationnelles et des outils mieux normalisés pour faire face à d'éventuelles urgences de sécurité des denrées alimentaires.

Références bibliographiques

- Caprioli A, Morabito S, Brugère H, Oswald E. 2005. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. *Vet. Res.*, 36: 289-311.
- European Food Safety Authority. 2009. Technical specifications for the monitoring and reporting of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) on animals and food (VTEC surveys on animals and food) on request of EFSA. *EFSA Journal*; 7(11):1366.
- European Food Safety Authority. 2007. Monitoring of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) and identification of human pathogenic VTEC types. *EFSA Journal*, 579: 1-61.
- EFSA-ECDC. 2010. Trends and sources of zoonoses and zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008. *EFSA Journal*; 8 (1): 1496.
- Karmali MA, Mascarenhas M, Shen S, Ziebell K, Johnson S, Reid-Smith R, Isaac-Renton J, Clark C, Rahn K, Kaper JB. 2003. Association of genomic O island 122 of *Escherichia coli* EDL 933 with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* seropathotypes that are linked to epidemic and/or serious disease. *J. Clin. Microbiol.*, 41: 4930-4940.