



## Point de vue

### Le rôle des laboratoires de référence de l'Union européenne lors d'une crise de sécurité alimentaire: l'expérience du LR-UE pour *Escherichia coli* lors de la récente épidémie d'*E. coli* O104:H4

A. Caprioli (1) (alfredo.caprioli@iss.it), S. Morabito (1), K. De Smet (2) \*

(1) Laboratoire de référence de l'UE pour l'*Escherichia coli*, Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Istituto Superiore di Sanità, Viale Regina Elena 299, 00161 Rome, Italie

(2) Commission européenne, Direction générale de la santé et des consommateurs (DG Sanco), 1049 Bruxelles, Belgique

A. Caprioli, S. Morabito, K. De Smet (2012). *Le rôle des laboratoires de référence de l'Union*

*européenne lors d'une crise de sécurité alimentaire : l'expérience du LR-UE pour Escherichia coli lors de la récente épidémie d'E. coli O104:H4*, EuroReference, N° 6, ER06-12P01. <http://www.anses.fr/euroreference/numero6/PN2001.htm>



**Le LR-UE pour *Escherichia coli* a joué un rôle actif lors des récents foyers épidémiques d'*E. coli* O104:H4 survenus en Europe. Sur la base des activités menées au cours de l'année précédente, une méthode de détection de la souche épidémique dans les aliments a été rapidement mise au point et diffusée à l'ensemble du réseau de laboratoires nationaux de référence (LNR), accompagnée des matériaux de référence appropriés. Le LR-UE a également testé différents types d'échantillons et organisé une étude inter-laboratoires sur la détection des VTEC (*E. coli* producteurs de vérotoxines) dans les graines utilisées pour la production de germes. Pendant toute la durée de la crise, le LR-UE a fourni un soutien scientifique et technique constant à la DG SANCO. De surcroît, le LR-UE a participé à la mission d'inspection effectuée par l'Office alimentaire et vétérinaire (OAV) en Égypte et a pris part à plusieurs initiatives et groupes de travail instaurés par l'EFSA et/ou l'ECDC. L'expérience des foyers épidémiques d'*E. coli* O104:H4 a confirmé que les activités des laboratoires de référence de l'Union européenne peuvent apporter une contribution non négligeable à la préparation de la Commission européenne aux éventuelles crises de sécurité alimentaire.**

Les laboratoires de référence de l'Union européenne (LR-UE) sont instaurés et financés par la Direction générale de la santé et des consommateurs (DG Sanco) pour aider la Commission européenne (CE) à faire face à des risques spécifiques liés à l'alimentation humaine et animale ou à des maladies animales spécifiques, conformément au règlement (CE) n°882/2004 relatif aux contrôles officiels. Lorsqu'un LR-UE est instauré, les États membres (EM) doivent désigner leur propre laboratoire national de référence (LNR) relevant du même domaine de compétence, afin de créer un réseau de laboratoires de l'UE sur ce thème. Les tâches et fonctions des LR-UE et des LNR sont respectivement décrites en détail aux articles 32 et 33 du règlement (CE) n°882/2004. Dans la pratique, les LR-UE sont chargés de: (1) développer des méthodes d'analyse de référence; (2) coordonner l'application de ces méthodes par les LNR, notamment en organisant des essais d'aptitude; (3) coordonner le réseau des LNR en les informant des progrès dans le domaine, en leur fournissant des matériaux de référence et en organisant des cours de formation spécifique sur des méthodes d'analyse; et (4) apporter une assistance scientifique et technique à la Commission, en particulier à la DG SANCO et à l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA). Les LNR sont pour leur part chargés d'assurer la collaboration avec leur LR-UE respectif, la coordination des activités des laboratoires impliqués dans les contrôles officiels

de leur propre pays, y compris l'organisation des essais d'aptitude, la diffusion des informations reçues du LR-UE, et l'assistance scientifique et technique à leurs autorités. Si tous les membres des réseaux s'acquittent de leurs tâches, les méthodes analytiques, les matériaux de référence, et les essais d'aptitude sont transmis par les LR-UE aux LNR, qui à leur tour les transmettent aux laboratoires locaux impliqués dans les contrôles officiels. L'objectif final de ces activités est qu'une quelconque denrée alimentaire produite ou importée dans un quelconque État membre de l'UE soit testée à l'aide des mêmes méthodes de pointe et avec des niveaux de maîtrise comparables. La valeur ajoutée de ces réseaux peut s'avérer particulièrement importante en cas de crise dans le domaine de la sécurité alimentaire affectant différents États membres: il est alors essentiel de pouvoir tester des aliments à l'aide de méthodes fiables, rapides et normalisées afin de fournir aux autorités compétentes les données nécessaires pour planifier des mesures de lutte adéquates et informer les consommateurs de manière appropriée.

La présente note a pour objet de décrire l'expérience du LR-UE pour *Escherichia coli* lors des récents foyers épidémiques d'*E. coli* O104:H4 survenus en Europe et d'examiner dans quelle mesure les activités effectuées aux cours des dernières années par notre réseau de laboratoires de référence pour *E. coli* ont aidé l'UE à se préparer à faire face à une telle crise.

\* Les points de vue ou positions exprimés dans ce texte sont ceux des auteurs et ne peuvent ni ne sauraient être considérés comme représentatifs du point de vue, de la position ou de la politique de la Commission européenne.



## Point de vue

### Le laboratoire de référence de l'UE pour *E. coli*

Les infections à VTEC (*E. coli* producteurs de vérotoxines) constituent un problème majeur de santé publique, parce qu'elles peuvent entraîner de graves maladies telles que la colite hémorragique et le syndrome hémolytique et urémique (SHU), et aussi en raison du nombre important de foyers se déclarant dans le monde entier (Caprioli *et al.*, 2005). En conséquence, les infections à VTEC ont été incluses dans la liste des zoonoses qui font l'objet d'une attention prioritaire dans les programmes de surveillance conformément aux dispositions de la directive 2003/99/CE; de plus, la CE a mis en place un laboratoire de référence de l'UE pour *Escherichia coli* producteur de vérotoxine en 2006.

Le LR-UE pour les VTEC est hébergé par l'Istituto Superiore di Sanità (ISS) à Rome et ses caractéristiques et ses activités ont déjà été décrites dans ce Journal (Caprioli *et al.*, 2010). Le réseau des LNR coordonnés par le LR-UE pour les VTEC inclut tous les États membres de l'UE, ainsi que des laboratoires d'autres pays européens ([www.iss.it/vtec](http://www.iss.it/vtec)).

### L'épidémie d'*E. coli* O104:H4 et ses sources possibles

Entre mai et juin 2011, une grave épidémie de diarrhée sanglante et de SHU associée à une infection à VTEC de sérotype inhabituel (*E. coli* O104:H4) s'est produite en Allemagne. De nombreux cas ont été rapportés dans d'autres pays européens, mais la plupart d'entre eux avaient contracté l'infection en voyageant en Allemagne. Le Centre européen de contrôle et de prévention des maladies (ECDC) faisait état de plus de 4000 cas, avec 786 cas de SHU et 46 décès ([http://ecdc.europa.eu/en/activities/sciadvise/Pages/Epidemiological\\_Updates.aspx](http://ecdc.europa.eu/en/activities/sciadvise/Pages/Epidemiological_Updates.aspx)). Les premières études épidémiologiques mettaient en évidence la consommation de salades composées comme principal facteur de risque pour contracter l'infection, et les analyses microbiologiques préliminaires désignaient les concombres importés d'Espagne comme source possible. Toutefois, les analyses complémentaires ne confirmaient pas la présence de la souche épidémique dans les concombres. Début juin, d'autres études épidémiologiques ont révélé que la consommation de graines germées produites par un seul producteur allemand était à l'origine de l'épidémie. Mais toutes les études microbiologiques effectuées par les autorités allemandes sur les germes, sur les graines utilisées pour la germination et sur les structures des installations ne parvenaient pas à isoler la souche épidémique (Frank *et al.* 2011).

Le 24 juin, un foyer distinct dû à un isolat de VTEC O104:H4 similaire à la souche épidémique allemande a été signalé en France (Gault *et al.* 2011). L'épisode impliquait 16 patients adultes et aucun lien direct avec l'Allemagne n'était mis en évidence. Toutefois, les patients avaient participé à une fête d'école au cours de laquelle ils avaient mangé des graines germées crues cultivées au sein même de l'école par les enfants. Ce second foyer étayait fortement l'hypothèse selon laquelle les graines germées étaient à l'origine de l'épidémie. La seule espèce de germes cultivée à la fois par l'école française et par le producteur allemand était le fenugrec, et les analyses de traçabilité en amont coordonnées par l'EFSA ont montré que dans les deux cas les graines provenaient de la même exploitation agricole en Égypte (EFSA, 2011a).

### La souche *E. coli* responsable de ces foyers

La souche épidémique appartient au sérotype peu courant O104:H4 et, fait surprenant, ne possède pas le gène *eae*,

marqueur génétique du mécanisme d'adhésion à la muqueuse intestinale par le processus d'attachement-effacement, marqueur qui est présent dans les sérogroupes VTEC le plus souvent associés à des maladies humaines graves. Toutefois, le sérotype O104:H4 présente un mode d'adhésion caractéristique nommé adhésion entéroaggrégative, typique d'un autre groupe de souches *E. coli* diarrhéogènes (Scheutz. *et al.* 2011). Le séquençage du génome a confirmé que la souche épidémique est une souche d'*E. coli* entéroaggrégative (EAEC) qui a acquis un phage porteur de VT (Mellmann *et al.* 2011). Cette combinaison inhabituelle de gènes de virulence avait déjà été décrite dans une souche VTEC O111 isolée à partir d'un foyer de SHU (Morabito *et al.* 1998) et pourrait expliquer la forte virulence de VTEC O104:H4.

### Le rôle du laboratoire de référence de l'UE pour *E. coli*

Depuis 2007, le LR-UE coordonne l'élaboration d'une norme internationale sur la détection des VTEC dans les denrées alimentaires et aliments pour animaux. La méthode est basée sur l'utilisation de la PCR en temps réel de cultures enrichies et vise à identifier les sérogroupes VTEC les plus impliqués dans les maladies humaines graves. Elle est sur le point d'être publiée en tant que spécification technique CEN ISO TDS 13136 appelée « Méthode horizontale pour la détection d'*Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC) appartenant aux sérogroupes O157, O111, O26, O103 et O145 – Méthode qualitative » et est 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). La méthode cible aussi bien les gènes de virulence (*vtx1* et *vtx2*, et *eae*) que les gènes spécifiques de sérotype, et le LR-UE a organisé quatre séries d'essais d'aptitude sur son utilisation. Au total 31 LNR ont participé aux essais et ont reçu les souches témoins de référence. Les rapports sont disponibles sur le site Internet du LR-UE ([www.iss.it/vtec](http://www.iss.it/vtec)).

La première étape de détection par PCR de la spécification CEN ISO TDS 13136 cible un gène *vtx2* qui est également présent dans la souche épidémique VTEC O104:H4. Par conséquent, lorsque l'épidémie s'est déclarée et qu'il est devenu urgent de rechercher des VTEC O104:H4 dans les denrées alimentaires, quasiment tous les LNR disposaient déjà d'une méthode appropriée pour contrôler les échantillons alimentaires et exclure la présence d'un quelconque type de VTEC. Toutefois, les étapes séquentielles prévues par la méthode n'ont pas pu être appliquées aux échantillons positifs pour *vtx*, puisque la souche épidémique VTEC O104:H4 ne contenait pas le gène *eae*, qui constitue la seconde cible de la méthode.

Grâce aux données de la littérature (Bugarel *et al.* 2010) et aux séquences ADN disponibles dans la banque de gènes, le LR-UE a mis au point un mode opératoire (SOP) pour la détection de la souche VTEC O104:H4 dans des échantillons d'aliments et pour le typage des souches isolées. Dans ce mode opératoire, les échantillons positifs pour *vtx* sont soumis à des PCR afin d'identifier les gènes associés aux antigènes O104 (*wzxO104*) et H4 (*fliCH4*). La méthode incluait également des protocoles détaillés pour l'isolement et la caractérisation complète de la souche VTEC O104:H4 à partir des échantillons identifiés positifs par la PCR. Une première version provisoire du SOP a été publiée sur le site internet du LR-UE le 27 mai, soit trois jours après l'annonce de la survenue de l'épidémie. La méthode



## Point de vue

a été évaluée le 1<sup>er</sup> juin, lorsqu'une souche épidémique VTEC O104:H4 de référence a été obtenue à l'Institut Robert Koch, et une seconde révision a été publiée le 2 juin, après un échange approfondi avec plusieurs LNR.

Au moyen de la souche de référence, le LR-UE a préparé et diffusé des échantillons d'ADN destinés à être utilisés comme témoins positifs dans les tests de biologie moléculaire pour la détection de la souche VTEC O104:H4. Entre le 3 juin et le 6 juin, ces préparations d'ADN de référence ont été envoyées aux LNR de 14 États membres de l'UE. Au cours des deux semaines suivantes, les échantillons ont été fournis à quatre autres LNR, à 19 autres laboratoires européens, et à cinq laboratoires en dehors de l'Europe. En outre, des scientifiques des LNR bulgare et polonais et de l'Université de Kafkas, en Turquie, se sont rendus dans le laboratoire de référence de l'UE pour les VTEC en juillet, afin d'y suivre une formation pratique sur les procédures analytiques.

La mise en cause des graines germées considérées comme source possible de l'épidémie a nécessité l'analyse des graines utilisées pour la production des germes destinés à être consommés crus. Étant donné que les essais sur les graines posent des problèmes techniques, le LR-UE a actualisé la SOP pour la détection des VTEC O104 en intégrant une annexe spécifiquement consacrée à ce sujet. La procédure actualisée a été publiée le 14 juin sur le site Internet du LR-UE. De surcroît, pour soutenir les LNR des États membres impliqués dans le RASFF (Système d'alerte rapide pour les denrées alimentaires et les aliments pour animaux) des graines et pour harmoniser les procédures mises en œuvre dans les différents laboratoires, le LR-UE a organisé une étude inter-laboratoires sur la détection des VTEC dans les graines. L'étude, réalisée en juillet, a inclus huit laboratoires et les résultats sont disponibles sur le site Internet du LR-UE.

Pendant toute la durée de la crise, le laboratoire de référence de l'UE pour les VTEC a fourni une assistance scientifique et technique à la DG SANCO. En particulier, le LR-UE a pris part à un groupe de travail qui incluait également les unités C/3 et G/4 de la DG SANCO, les points de contact du SAPR (Système d'alerte précoce et de réaction), les points de contact du RASFF, et des représentants de l'ECDC, de l'EFSA, et du Bureau régional de l'OMS pour l'Europe. Les objectifs du groupe étaient de fournir une mise à jour régulière de la situation épidémiologique et des recherches dans les États membres et de discuter de tous les problèmes potentiels liés à l'épidémie. Le groupe s'est réuni régulièrement par audioconférences au cours de la période comprise entre le 26 mai et le 30 juin. Les scientifiques du LR-UE ont également participé aux initiatives et groupes de travail suivants instaurés par l'EFSA et/ou l'ECDC :

- préparation du rapport scientifique « Urgent advice on the public health risk of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* in fresh vegetables », consultable à l'adresse <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/2274.pdf> ;
- le groupe de travail de l'EFSA mis en place pour coordonner la traçabilité en amont des graines impliquées dans l'épidémie. Le groupe de travail a produit le rapport technique « Tracing seeds [with a particular emphasis on fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*)] in relation to the O104:H4 Shiga toxin-producing *E. coli* 2011 Outbreak(s) » (EFSA, 2011a) ;

- l'évaluation conjointe EFSA/ECDC de l'épidémie VTEC O104, avec la préparation d'un document destiné à fournir une présentation générale et à servir de référence pour les mesures de gestion des risques, intitulé « STEC O104:H4 2011 Outbreaks in Europe: Taking Stock » (EFSA, 2011b) ;
- le groupe de travail « ad hoc » de l'EFSA mis en place pour émettre un avis scientifique sur « *The risk posed by Shiga toxin producing E. coli (STEC) and other pathogenic bacteria in seeds and sprouted seeds* ». L'avis sera publié fin novembre 2011.

Le LR-UE a également participé à une mission d'inspection en Égypte effectuée par l'Office alimentaire et vétérinaire (OAV) pour réaliser l'exercice de traçabilité en amont des lots importés de graines de fenugrec et évaluer les systèmes de production en place, y compris les contrôles de laboratoire. La mission a été effectuée en août et le rapport est consultable à l'adresse : [http://ec.europa.eu/food/fvo/index\\_en.cfm?reptoshow=3](http://ec.europa.eu/food/fvo/index_en.cfm?reptoshow=3).

Enfin, le LR-UE a été chargé d'effectuer des essais de laboratoire sur des échantillons alimentaires et des cultures bactériennes venant d'Allemagne, et sur des échantillons de graines venant d'Égypte.

### Réflexions sur les événements

La souche épidémique VTEC O104:H4 a présenté une combinaison inhabituelle de gènes de virulence, lui conférant un degré élevé de virulence. Cela confirme que les recombinaisons au sein des bactéries entériques peuvent générer de nouveaux phénotypes qui, une fois introduits dans une population vulnérable, peuvent poser de graves problèmes de santé publique.

L'épisode a confirmé que la contamination de la chaîne alimentaire végétale par le VTEC peut déboucher sur de vastes foyers épidémiques majeurs.

Outre les coûts humains, cette épidémie a entraîné une baisse considérable de la confiance des consommateurs dans la consommation des légumes, d'où la baisse de la demande sur l'ensemble du marché des légumes, et des conflits commerciaux entre l'UE et des pays tiers tels que la Fédération de Russie et l'Égypte, respectivement pour l'exportation et l'importation de légumes.

Lorsque les foyers épidémiques sont apparus, et qu'il s'est avéré urgent de tester les aliments, le réseau des laboratoires de référence de l'UE pour l'*E. coli* disposait déjà d'une méthode de détection adaptée, éprouvée par plusieurs séries d'essais d'aptitude. La méthode a été rapidement modifiée en vue d'intégrer la spécificité de la souche VTEC O104:H4 et les matériaux de référence adéquats ont été diffusés aux LNR.

La capacité d'un réseau de laboratoires à déployer une réponse rapide et efficace en cas d'urgence dépend largement des activités menées en amont, notamment en matière d'échange de méthodes et de matériaux de référence et de participation aux études inter-laboratoires.

Les laboratoires de référence de l'UE, de par leurs activités, peuvent jouer un rôle important dans la préparation de la Commission européenne à faire face à des crises de sécurité alimentaire.



## Point de vue

### Références bibliographiques

- [1] Bugarel M., Beutin L., Martin A., Gill A., Fach P. 2010. Micro-array for the identification of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) seropathotypes associated with Hemorrhagic Colitis and Hemolytic Uremic Syndrome in humans. *Int J Food Microbiol.*, 142: 318-29.
- [2] 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.
- [3] Caprioli A., Morabito S., Scavia G., Tozzoli R., Graziani C., Ferreri C., Minelli F., Marziano M.L., Babbs S. 2010. The European Union Reference Laboratory for Verocytotoxin (VT)-producing *Escherichia coli* (VTEC), hosted by the Istituto Superiore di Sanità, Rome. *EuroReference*, No. 4, ER04-10F01, <http://www.anses.fr/euroreference/numero4/PN40I0.htm>
- [4] 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.
- [5] European Food Safety Authority. 2011a. Tracing seeds, in particular fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) seeds, in relation to the Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) 104:H4 2011 Outbreaks in Germany and France. Available at <http://www.efsa.europa.eu/en/supporting/doc/176e.pdf>
- [6] European Food Safety Authority. 2011b. Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) O104:H4 2011 outbreaks in Europe: Taking Stock. *EFSA Journal*, 9(10):2390.
- [7] Frank C., Werber D., Cramer J.P., Askar M., Faber M., an der Heiden M., Bernard H., Fruth A., Prager R., Spode A., Wadl M., Zoufaly A., Jordan S., Kemper M.J., Follin P., Müller L., King L.A., Rosner B., Buchholz U., Stark K., Krause G. for the HUS Investigation Team. 2011. Epidemic Profile of Shiga-Toxin-Producing *Escherichia coli* O104:H4 Outbreak in Germany. *N. Engl. J. Med.* 365:1771-1780.
- [8] Gault G, Weill FX, Mariani-Kurkdjian P, Jourdan-da Silva N, King L, Aldabe B, Charron M, Ong N, Castor C, Macé M, Bingen E, Noël H, Vaillant V, Bone A, Vendrely B, Delmas Y, Combe C, Bercion R, d'Andigné E, Desjardin M, de Valk H, Rolland P. 2011. Outbreak of haemolytic uraemic syndrome and bloody diarrhoea due to *Escherichia coli* O104:H4, south-west France, June 2011. *Eurosurveillance*, 16(26):pii=19905. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19905>
- [9] Mellmann A., Harmsen D., Cummings C.A., Zentz E.B., Leopold S.R., Rico A., Prior K., Szczepanowski R., Ji Y., Zhang W., McLaughlin S.F., Henkhaus J.K., Leopold B., Bielaszewska M., Prager R., Brzoska P.M., Moore R.L., Guenther S., Rothberg J.M., Karch H. 2011. Prospective Genomic Characterization of the German Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O104:H4 Outbreak by Rapid Next Generation Sequencing Technology. *PLoS ONE*. 6(7): e22751. doi:10.1371/journal.pone.0022751
- [10] Morabito S., Karch H., Mariani-Kurkdjian P., Schmidt H., Minelli F., Bingen E., Caprioli A. 1998. Enterohemorrhagic, Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111: H2 associated with an outbreak of hemolytic-uremic syndrome. *J Clin Microbiol.* 36:840-2.