



# Labinfo

**Publication destinée aux laboratoires de sécurité alimentaire agréés**

- 4 Les annales de *Xylella fastidiosa*
- 16 La spectrométrie de mobilité ionique (IMS) : un soutien aux analyses de pesticides par screening
- 19 Organisation et résultats de Tests d'Aptitude sur les méthodes analytiques multi-mycotoxines
- 26 Détection simultanée de dix familles d'antibiotiques dans la viande par cytométrie de flux
- 29 Le séquençage complet du génome pour aider les laboratoires de contrôle dans le développement de méthode de détection ciblant un *Bacillus subtilis* génétiquement modifié non-autorisé en UE, surproduisant la riboflavine.
- 32 Workshops & Symposia



### LabInfo

Publication destinée aux laboratoires de sécurité alimentaire agréés

### Equipe de rédaction

Dirk Courtheyn, Alain Dubois, Marc Evrard, Geert Janssens et Marie-Christine Wilem

### Ont participé à ce numéro :

Bert Matthijs, Johan Van Vaerenbergh, Laure Joly, Séverine Gosciny, Vincent Hanot, Philippe Szternfeld, Edwin De Pauw, Gauthier Eppe, Philippe Debongnie, Emmanuel K. Tangni, Bart Huybrechts, Alfons Callebaut, Anne-Catherine Huet, Sigrid De Keersmaecker, Nina Papazova et Nancy Roosens

### Traduction

Service de traduction de l'Agence  
Equipe de rédaction

### Photos et illustrations

Fournies par les laboratoires

### Mise en page

Gert Van Kerckhove

### Secrétariat de rédaction

LabInfo  
p.a. D. Courtheyn  
AFSCA  
CA-Botanique – Food Safety Center  
4ème étage, bureau K04/120218  
Boulevard du Jardin botanique 55  
1000 Bruxelles  
Tel 02.211.87.33  
dirk.courtheyn@favv.be

Cher lecteur,

Plus de six mois se sont déjà écoulés depuis la dernière édition de Labinfo. Plusieurs changements sont entre-temps survenus au sein du management de la DG Laboratoires.

Le 1<sup>er</sup> janvier, Yasmine Ghafir a été désignée directrice des laboratoires externes, après que Dirk Courtheyn ait assuré avec beaucoup de professionnalisme la période de transition faisant suite au départ à la retraite de Walter Smedts. Yasmine travaillait déjà depuis 10 ans au service d'encadrement de l'Administrateur délégué de l'AFSCA, où elle assurait entre autres le suivi des objectifs du business plan, la rédaction finale du rapport d'activités et le suivi de la DG Laboratoires. Avant cela, elle avait travaillé pendant 10 autres années dans le Laboratoire de microbiologie des denrées alimentaires, à la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Liège (aux côtés du Professeur Georges Daube), en tant que responsable du laboratoire national de référence en microbiologie pour l'AFSCA.

Début janvier, après une carrière de 16 ans à l'AFSCA, Sacha Diaine a quitté l'Agence pour relever un nouveau défi dans le monde des entreprises, rendant ainsi vacant le poste de directeur des laboratoires de l'AFSCA.

Le 1<sup>er</sup> avril, Mandy Lekens a donc été désignée directrice des laboratoires de l'AFSCA après avoir occupé ce poste *ad interim* pendant quelques mois. Mandy travaillait déjà depuis 15 ans au laboratoire de Tervuren, dont elle a assuré la direction pendant 9 ans. Avant cela, elle travaillait dans le même laboratoire en tant que chef des sections Contaminants et Additifs.

Depuis le départ de Mandy Lekens, la gestion quotidienne du laboratoire de Tervuren est assurée *ad interim* par Mieke Vanbrabant, chef de la section Additifs.

Nous sommes convaincus que Yasmine, Mandy et Mieke s'acquitteront de leurs nouvelles tâches avec succès.

Le présent numéro de Labinfo se penche sur une série de nouvelles techniques en matière de sécurité alimentaire, ainsi que sur de nouvelles menaces. Un article remarquable traite de la bactérie *Xylella*, qui constitue un véritable cauchemar pour les régions sinistrées ou menacées. Un autre article traite de l'organisation des ring tests uniques mis en place chaque année par le CERVA en vue d'évaluer les méthodes d'analyses multi-mycotoxines à partir de matériel contaminé « naturellement », ainsi que des résultats de ces ring tests. Cet article a été rédigé par le très apprécié et passionné chercheur Philippe Debongnie, décédé inopinément le 26 juillet 2016. Nos pensées vont à sa famille et à ses collaborateurs.

Je vous souhaite beaucoup de plaisir à la lecture de cette quinzième édition de Labinfo.

Bert Matthijs  
Directeur général Laboratoires

# Les annales de *Xylella fastidiosa*

Johan Van Vaerenbergh

Instituut voor Landbouw- en Visserijonderzoek, Végétaux, Protection des végétaux

Diagnosecentrum voor Planten, Burg. Van Gansberghelaan 96, 9820 Merelbeke

## La situation en un mot

Octobre 2013. Un parfum d'inquiétude alarmait le monde phytosanitaire européen suite à la notification officielle que la présence de la bactérie *Xylella fastidiosa* était constatée dans des oliviers malades au sud de l'Italie. Des oliviers centenaires de la péninsule de Salento en région des Pouilles souffraient depuis quelques années du 'Complesso del Disseccamento rapido dell'Olivo'. Le diagnostic préalable de champignons du bois et des dégâts dus aux galeries creusées par la chenille de la zeuzère du poirier (*Zuzera pyrina*) n'était pas convainquant comme cause primaire du dépérissement car de nombreux oliviers desséchés ne présentaient aucune atteinte de ces organismes. La cause primaire a été établie par la détection et l'identification de *Xylella fastidiosa*, ce qui a immédiatement conduit à des mesures de confinement et à la destruction des oliviers infectés. Entre-temps, le nombre d'oliviers atteints s'élève à plus d'un million, malgré les processions et les bénédictions des vergers. *Xylella* a également attaqué le plus vieux et le plus légendaire olivier de la région, le 'Gigante di Alliste' vieux de quelques 1500 ans.

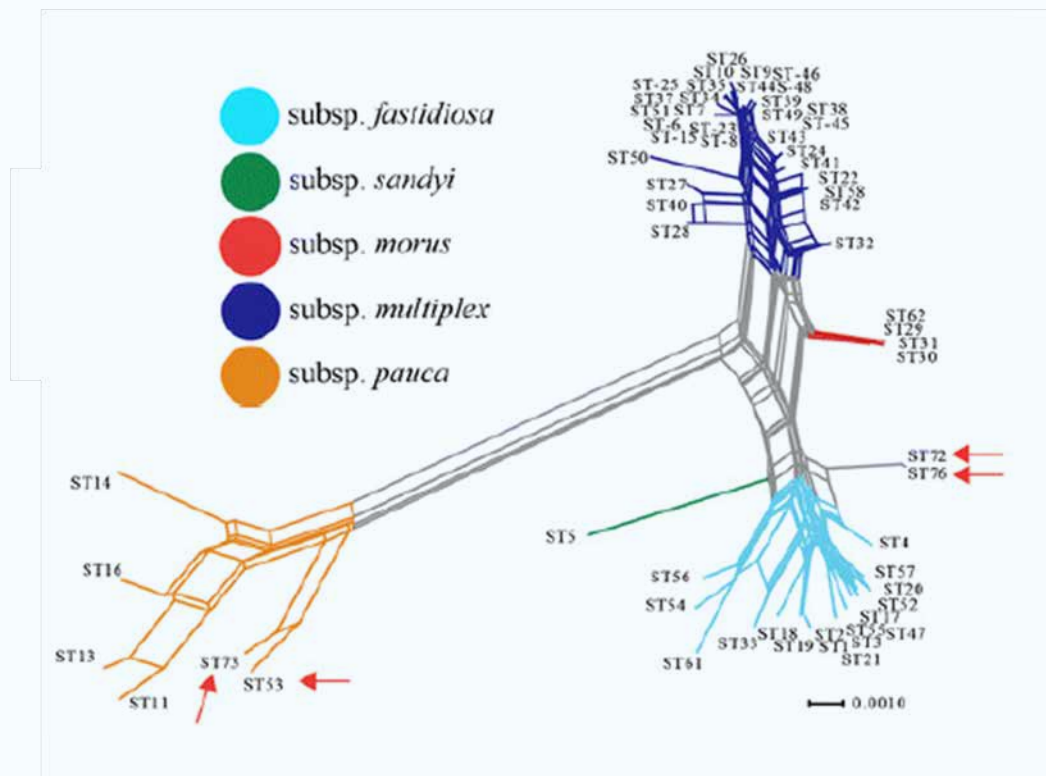


Figure 1. Réseau phylogénétique de types de séquence (TS) de *Xylella fastidiosa* par MLST de 7 gènes bactériens (Scally et al., 2005). Les sous-espèces *fastidiosa*, *multiplex* et *pauca* sont fortement hétérogènes (structure ramifiée) en raison de recombinaison génétique (Loconsole et al., 2016).

ST53 = *X.f.subsp. pauca*, souche CODiRO d'oliviers des Pouilles, Italie (2013).

ST73 = *X.f.subsp. pauca*, de *Coffea arabica* du Costa Rica (interception en Italie, 2015)

ST72 et ST76 = souches de *Coffea arabica* du Costa Rica (interception en Italie, 2015) avec caractéristiques génétiques tant de *X.f.subsp. fastidiosa* que de *X.f. subsp. sandyi*

ST16 = *X.f.subsp. pauca*, de *Coffea arabica* au Brésil et également constatée dans des oliviers au Brésil.

Entre-temps, la bactérie *Xylella* a également été découverte lors de la surveillance phytosanitaire obligatoire, dans 22 autres arbres et arbustes méditerranéens, entre autres les lauriers roses, amandiers, spartiers à tige de jonc (*Spartium junceum*), Polygales à feuilles de Myrte (*Polygala myrtifolia*), *Acacia saligna*, *Westringia fruticosa*, *Rhamnus alaternus*, *Myrtus communis*... L'analyse génétique par MLST (Multi Locus Sequence Typing) a manifestement démontré que dans toutes ces plantes, il s'agit d'une seule et même souche de *Xylella fastidiosa* (souche CoDiRO, type de séquence (ST) 53 en figure 1). L'étude a également confirmé qu'une seule introduction, probablement entre 2008 et 2010 est responsable des dégâts dans les oliviers et le paysage méditerranéen (Saponari *et al.*, 2013 ; Saponari *et al.*, 2014 ; Martelli *et al.*, 2016 ; Loconsole *et al.*, 2016).

*Xylella fastidiosa* est surtout connue dans les vignobles et la viticulture aux États-Unis et dans la culture des agrumes en Amérique du Sud, principalement au Brésil. Aux États-Unis, la bactérie a également été retrouvée dans des plantes ornementales et des arbres du paysage urbain. En Amérique centrale et latine, elle se rencontre souvent dans des caféiers (Rodriguez *et al.*, 2001 ; Montero-Astúa *et al.*, 2008). En Asie, la bactérie a été décelée à Taïwan, d'abord dans des poiriers Nashi (Leu & Su, 1993), mais il s'est avéré ultérieurement qu'il s'agissait d'un autre type de *Xylella* qui est provisoirement connue sous le nom de *Xylella taiwanensis* (Chen *et al.*, 2014). Ensuite, la présence de *Xylella fastidiosa* a été constatée dans des ceps de vigne (Su *et al.*, 2013). En Iran, la présence de *Xylella fastidiosa* a été confirmée dans des ceps de vigne et des amandiers (Amanifar *et al.*, 2014) mais les souches de la bactérie n'ont pas été complètement identifiées, ni déposées dans une collection de cultures bactériennes. Les notifications de la Turquie (Güldür *et al.*, 2005) et du Liban (Temsah *et al.*, 2015) n'ont pas été justifiées par l'isolement de la bactérie et, par conséquent, elles restent incertaines. Les annales de *Xylella* en UE commencent en réalité en 2012 lorsque la présence de la bactérie est constatée en France dans des caféiers provenant du Mexique (*Coffea canephora*) et d'Équateur (*Coffea arabica*) détenus par Nestlé R&D à Tours dans une serre de biosécurité pour multiplication in-vitro (Legendre *et al.*, 2014 ; Jacques *et al.*, 2016). En 2014, la bactérie a de nouveau été détectée dans des caféiers, provenant cette fois du Costa Rica, importés aux Pays-Bas (Bergsma *et al.*, 2014). Au moment de cette constatation, les caféiers avaient déjà été distribués en UE et des notifications de *Xylella* ont été reçues de France, d'Italie, d'Autriche, d'Allemagne et du Royaume-Uni. Ces événements ont incité la Commission européenne à prendre des mesures d'urgence destinées à empêcher l'introduction et la dissémination de cette bactérie (Arrêté 2015/789). Chaque État membre a été contraint de réaliser un monitoring sur son territoire, surtout en surveillant les espèces végétales particulièrement sensibles à la bactérie. Suite à ces mesures, en juillet 2015, la présence de *Xylella fastidiosa* a été constatée en Corse et en octobre 2015 en France le long de la côte d'Azur (Nice, Antibes, Toulon). Les constatations ont à chaque fois été principalement faites dans des polygales à feuilles de Myrte, *Polygala myrtifolia* (EPPO, 2015).

*Xylella fastidiosa* se retrouve exclusivement au niveau des systèmes de transport de l'eau dans la plante. Les symptômes sont la conséquence d'une perturbation de l'approvisionnement en eau des feuilles et passent facilement pour des dégâts dus à la sécheresse. Souvent, les feuilles présentent une coloration automnale avec dessèchement du bord de la feuille, souvent accompagnée d'une délimitation jaune (*leaf scorch* ou *leaf scald*, figure composée 2A/B/C/D), suivie d'un dessèchement de l'ensemble des feuilles et des branches, d'un retard de croissance et finalement d'un dessèchement de l'ensemble de la plante. Les symptômes sont plus ou moins prononcés selon l'espèce végétale, la variante de *Xylella* et les conditions environnementales.

Principalement, *Xylella fastidiosa* touche des plantes ligneuses. La bactérie n'est pas très sélective. Elle a déjà été rapporté chez plus de 300 espèces végétales appartenant à 63 familles botaniques. Dans de nombreuses espèces végétales, le processus d'infection est toutefois imprévisible et il s'écoule parfois plusieurs mois avant que la présence de la bactérie ne devienne visible. La plupart des espèces végétales dans lesquelles *Xylella* a été détectée présentent peu voire même aucun symptôme mais elles sont bien porteuses de la bactérie et constituent un réservoir de transmission à d'autres espèces végétales peut-être plus sensibles. *Xylella* est visiblement nuisible pour les espèces végétales avec lesquelles elle n'a jamais été en contact. Un exemple flagrant sont les ravages dans les ceps de vignes européennes (*Vitis vinifera*) en Californie bien que de nombreux ceps de vigne américains (entre autres *Vitis rotundifolia*) soient porteurs sans présenter de symptômes. L'introduction de *Xylella* dans le bassin méditerranéen a déjà entraîné des infections dans 41 nouvelles espèces végétales, dont la lavande, *Pelargonium* et *Cistus* (ciste).







Figure 2A.  
*X.f. subsp. multiplex* dans *Polygala myrtifolia*.  
 Crédit: Bruno Legendre, SPV-Anses, Angers, France



Figure 2B.  
*X.f. subsp. multiplex* dans un orme.  
 Crédit: Brian Olson, Oklahoma State University @ Bugwood.org



Figure 2C.  
*X.f. subsp. fastidiosa* dans un cep de vigne (maladie de Pierce).  
 Crédit: PD/GWSS Board, California Department of Food and Agriculture



Figure 2D.  
*X.f. subsp. pauca* dans des oliviers  
 Crédit : <http://www.centumcellae.it>

Il existe plusieurs variantes de *Xylella fastidiosa*, chacune ayant plus ou moins sa propre zone de répartition et ses préférences en termes d'espèces végétales. On distingue habituellement 5 variantes (sous-espèces) :

- *X. f.* subsp. *fastidiosa*: principalement dans les ceps de vigne (par exemple la variante primaire occasionnant la maladie de Pierce) et les amandiers.
- *X. f.* subsp. *multiplex*: variante touchant la plus grande diversité d'espèces végétales, dont l'amandier et d'autres espèces de Prunus, ainsi que des plantes ornementales et des feuillus du paysage urbain tels que le chêne, le platane, l'érable et l'orme. Cette variante a été identifiée en Corse et le long de la Côte d'Azur en France.
- *X. f.* subsp. *pauca*, dans les agrumes, en particulier dans les oranges, et les caféiers. Cette variante a été constatée dans des oliviers et différents arbustes méditerranéens du sud de l'Italie.
- *X. f.* subsp. *sandyi*, jusqu'à présent uniquement sur laurier rose aux États-Unis.
- *X. f.* subsp. *morus*, jusqu'à présent uniquement dans les mûriers (*Morus alba*) aux États-Unis

Une sixième variante potentielle, *X. f.* subsp. *tashke* a été constatée dans *Chitalpa tashkentensis* au Nouveau Mexique, États-Unis.

La souche primitive de *Xylella* remonte probablement à des milliers d'années sur le continent américain. Il est présumé que la bactérie coexistait sans trop de dégâts en association avec les plantes dans l'environnement naturel. La variante *multiplex* aurait évolué dans le climat tempéré d'Amérique du Nord, la variante *fastidiosa* en Amérique centrale et la variante *pauca* en Amérique latine. La variante *fastidiosa* provoquant la maladie de Pierce dans les ceps de vigne aurait été introduite en Californie depuis l'Amérique centrale via le Mexique vers 1880 (Nunney *et al.*, 2010). Le contact avec les ceps de vigne européens a eu des conséquences désastreuses. En 1890, 16.000 ha de vignobles étaient détruits dans le bassin de Los Angeles. Inversement, la variante *multiplex* d'Amérique du Nord a été introduite en Amérique latine. Le contact avec la variante indigène *pauca* a fait apparaître des souches recombinantes pouvant plus facilement infecter les agrumes et le café (Nunney *et al.*, 2012).

Une introduction depuis le continent américain est suspectée tant pour le sud de l'Italie que pour la Corse et la France. En effet, la souche ST53 du sud de l'Italie est pratiquement identique à la souche ST73 des caféiers du Costa Rica (Loconsole *et al.*, 2016, voir figure 1). La variante *pauca* a également été découverte dans des oliviers au Brésil (Coletta-Filho *et al.*, 2016) et en Argentine (Haelterman *et al.*, 2015). Le profil génétique de la souche *Xylella* des oliviers du Brésil est identique au profil ST16 de la souche COF0238 de *Coffea arabica* du Brésil. Les souches *multiplex* de Corse et de la côte méditerranéenne de la France sont étroitement apparentées aux souches des amandiers et pruniers aux États-Unis.

Bien que *Xylella fastidiosa* soit reprise dans la législation européenne sur la santé des végétaux depuis sa première édition du 21 décembre 1976 (à présent Directive 2000/29/CE et AR du 10/08/2005), de nombreux 'plantes hôtes de *Xylella*' ont été importées en UE depuis le continent américain pendant des années sans aucun contrôle de la présence latente. Cela nourrit le présomption que *Xylella* a déjà accosté en Europe beaucoup plus tôt. Mais tant qu'elle ne cause pas de dégâts manifestes dans les pépinières, dans les plantes cultivées ou dans le paysage, elle passe inaperçue. Des plantes infectées ne présentant pas de symptômes sont particulièrement inquiétantes lorsqu'elles sont importées depuis des régions où *Xylella* est présente. Elles peuvent arriver n'importe où dans l'UE, et donc également dans des endroits, comme le sud de l'Italie, où la formule 'bactérie, plante et conditions environnementales' est optimale pour la prolifération de la maladie. Jusqu'à présent, il n'y a aucune indication que la présence de *Xylella* dans les oliviers et dans le paysage urbain et naturel du sud de l'Italie représente une menace pour les ceps de vigne et les agrumes. Cependant, l'implication de la recombinaison génétique est considérable pour *Xylella fastidiosa* et semble être un puissant catalyseur pour l'apparition de nouvelles variantes, surtout dans les zones où la bactérie a été introduite. Il n'est pas illusoire que les souches actuellement présentes en Europe se rencontrent un jour et fassent apparaître de nouvelles variantes adaptées aux ceps de vigne ou aux agrumes.





## Biologie de *Xylella* et son comportement dans la plante.

Il est clair que *Xylella* n'est pas transmise en touchant une plante. La bactérie se trouve en effet au niveau du système de transport de l'eau dans la plante. La dissémination naturelle se fait par les insectes qui piquent le xylème pour se nourrir. Ces insectes qui transmettent la bactérie en aspirant le liquide sont des cicadelles (Redak *et al.*, 2004). Ils appartiennent à l'ordre des hémiptères (*Hemiptera*). Tout comme d'autres insectes, leur classification est sujet au changement. Le groupe est aujourd'hui connu sous le nom d'*Auchenorrhyncha*, les petits insectes sautants. Les principales espèces sont les cicadelles (sharpshooters ou leafhoppers, *Cicadellidae*) et les cercopes des prés ou philènes spumeuses (froghoppers ou spittlebugs, *Cercopidae*).

Dans les Pouilles, le principal vecteur de *Xylella* est la philène spumeuse *Philaenus spumarius* (figure 3A/B). Cet insecte est couramment observé dans toute l'Europe, et donc aussi en Belgique. Aux États-Unis, il est également présent mais la cicadelle ne joue pas vraiment de rôle dans la biologie de *Xylella*. L'hivernage se fait généralement sous la forme d'œuf de sorte que l'insecte doit à chaque fois être recontaminé. Lors d'hivers doux, il semble que l'insecte adulte puisse survivre et la *Xylella* dont il est porteur également, comme dans les régions méditerranéennes où *Xylella* réside dans la végétation naturelle.



Figure 3A.  
La philène spumeuse *Philaenus spumarius*, vecteur de *Xylella fastidiosa* dans les Pouilles.  
Crédit: Kai Rösler, 2009 @

Figure 3B.  
Larve (nymphe) de philène spumeuse *Philaenus spumarius*.  
Crédit: J. Skaftason @ <http://ftp.funet.fi>





Le liquide du xylème est assez pauvre en nutriments et par conséquent, une grande quantité de liquide du xylème est à chaque fois ingérée. De nombreuses cellules de *Xylella* peuvent donc également être absorbées. La présence de *Xylella* dans le vecteur est bien documenté pour les vecteurs du continent américain. Après ingestion, la bactérie s'accroche à la paroi de la gorge et de la partie supérieure de l'œsophage et s'installe ensuite dans une pellicule de cellules dressées (Purcell *et al.*, 1979 - figure 3C). Apparemment, les cellules de *Xylella* ingérées doivent être pré-conditionnées à cet effet (Hill & Purcell, 1997). La bactérie ne va pas s'installer dans l'insecte quand des cellules mobiles sont ingérées. La bactérie peut également se multiplier dans le biofilm (Newman *et al.*, 2004). La bactérie n'a pas besoin d'une période d'incubation dans le vecteur et elle sera transmise presque immédiatement après l'absorption. Les stades larvaires (nymphe) peuvent également absorber et propager *Xylella* mais ils perdent la bactérie à chaque mue. L'insecte adulte est contagieux toute sa vie durant. Des recherches sont en cours pour examiner le comportement de la bactérie dans le(s) vecteur(s) européen(s). Les cicadelles sont polyphages mais manifestent tout de même une préférence pour certaines espèces végétales. L'efficacité de la transmission n'est pas égale pour chaque espèce végétale. Elles volent sur une courte distance mais elles sont toutefois aussi emportées passivement sur de plus longues distances (alien hitchhikers).

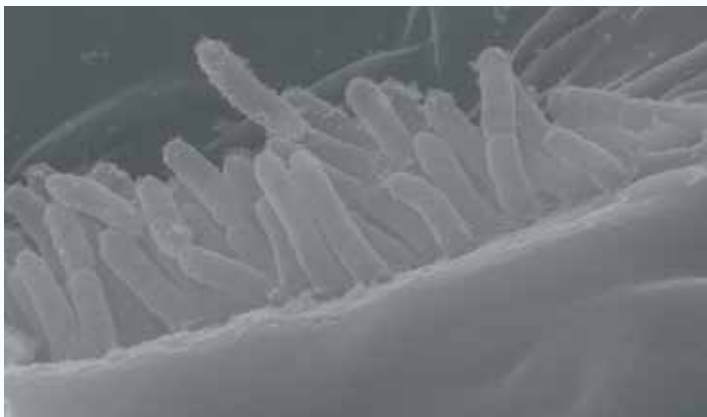


Figure 3C. *Xylella fastidiosa* installée en tant que cellules dressées dans un biofilm de la gorge de *Graphocephala atropunctata* (Killiny *et al.*, 2009).

Certaines espèces végétales manifestent un syndrome évident après infection, mais dans (un bon nombre) d'autres espèces, la présence de la bactérie est imperceptible. Cela dépend du mode de vie de *Xylella* dans la plante. Elle préfère errer à travers le xylème de la plante en tant que bactérie libre (cellules planctoniques). Si *Xylella* se fixe sur la paroi du xylème, des micro-colonies peuvent alors croître en biofilm et agrégats faisant ainsi obstacle au courant libre de l'eau (figure 4). Un composé chimique synchronise la communication entre les cellules de *Xylella* et organise la formation des agrégats. La bactérie est à ce moment elle-même confrontée à des problèmes car elle est coupée de son approvisionnement en eau et en nutriments. Elle doit inciter une route d'évasion en perçant des ouvertures dans le septum entre deux canaux de xylème et migrer vers un autre canal voisin où les conditions de vie sont plus favorables. Dans le xylème obstrué, on retrouve principalement des cellules de *Xylella* mortes.

La transition de cellule errante à agrégat et donc la conversion de présence latente en maladie sont régies par divers facteurs. Plusieurs déclencheurs ont été étudiés dans les ceps de vigne mais pas dans d'autres espèces végétales. Entre autres le pH et la composition chimique du liquide du xylème déterminent si *Xylella* sera présente de manière planctonique ou en agrégats (Zintsun, 2006 ; Andersen *et al.*, 2007). *Xylella* a indubitablement encore d'autres atouts, comme des enzymes qui s'attaquent à la paroi du canal de xylème et incitent la plante de déposer du callose pour renforcer la paroi (Nascimento *et al.*, 2016). L'accumulation de callose rétrécira également les canaux de xylème comme le cholestérol dans les veines. Dans le cadre du projet XYLERIS (financement par le SPF Santé publique, Sécurité de la Chaîne alimentaire et Environnement), l'ILVO étudie l'impact de nos conditions climatiques sur la prolifération des variantes de *Xylella* dans divers espèces de plantes. Des conditions de sol spécifiques comme riche ou pauvre en nutriments et humide ou aride sont analysées en tant que mécanismes déclencheurs potentiels de la phase pathogène de *Xylella* dans la plante.



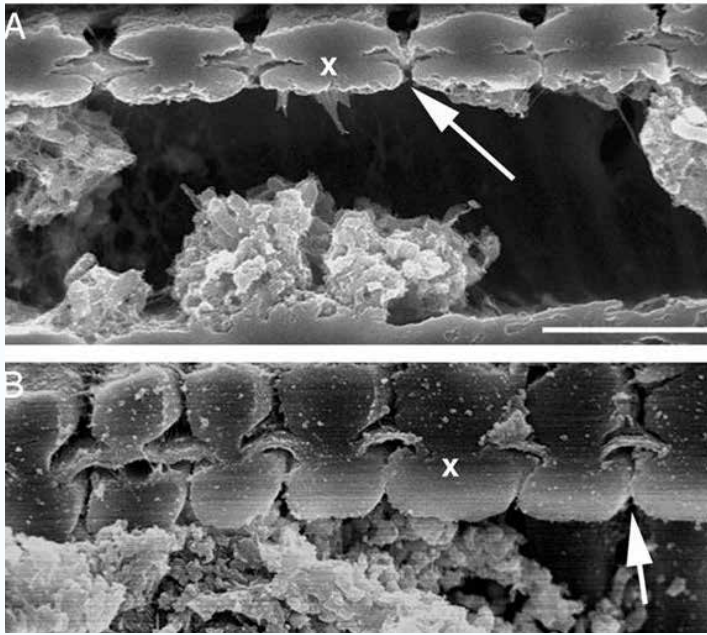


Figure 4.  
Agrégats de *Xylella fastidiosa* dans une conduite de xylème d'un cep de vigne. La flèche indique un trou dans la membrane le long duquel la bactérie peut s'échapper vers une conduite voisine en cas de surpopulation (Newman et al., 2004).

La densité de *Xylella* dans la plante varie fortement selon la saison et les conditions environnementales puisque celles-ci influencent la quantité de liquide du xylème et la composition chimique de ce dernier. Les plus fortes concentrations de *Xylella* sont constatées pendant les mois d'été. Par contre, il semble que le froid limite l'activité de la bactérie. Pour sa survie, la bactérie a besoin d'hivers doux afin que les plantes restent en vigueur et n'entrent pas vraiment en dormance. Les régions plus septentrionales semblent donc échapper aux conséquences destructrices de *Xylella*. Les constatations de *Xylella* faites le plus au nord ont été enregistrées à environ 50° de latitude nord sur des arbres feuillus dans le paysage urbain. A l'automne, la bactérie semble se retirer de la cime et recherche l'abris du tronc et des racines pendant l'hiver pour se déplacer à nouveau au printemps vers les branches et rameaux. Les "hotspots" écogéographiques pour *Xylella* en Europe ont été colorés sur la carte après avoir pris 19 facteurs climatologiques en considération (Bosso et al., 2016).



« Hotspots » écogéographiques pour *Xylella fastidiosa* en Europe. La limite au nord s'étend du Portugal et du centre de l'Espagne vers le nord de la Turquie en passant par Madrid et les Baléares, la Corse et la côte Tyrrhénienne au sud de Rome, le sud de l'Italie, les régions côtières du Monténégro et d'Albanie ainsi que le sud de la Grèce au dessus de Delphes et Athènes. Il y a également quelques "hotspots" à la Côte d'Azur. L'Afrique du Nord et le Proche Orient se prêtent parfaitement à l'installation de la bactérie. Aucun "hotspot" n'est attendu en Belgique.

## Inspection par l'AFSCA et diagnostic à l'ILVO

La détection de *Xylella fastidiosa* est capitale pour la protection des cultures, des pépinières, des espaces verts publics et du paysage urbain. L'AFSCA réalise des contrôles à l'importation, ainsi que des inspections dans les pépinières et les jardinerie. La voie de propagation la plus efficace de la bactérie sur de longues distances est le commerce et le transport de plantes contaminées. Depuis le 19 mai 2015, 160 espèces végétales appartenant à 27 familles botaniques n'entrent plus en UE. Les exigences d'importation impliquent, notamment que le pays exportateur doit établir de manière irréfutable que *Xylella fastidiosa* n'y est pas présente. La mesure vaut également pour le matériel issu de culture *in vitro* de ces plantes.

*Xylella fastidiosa* a le statut d'organisme particulièrement nuisible dans la réglementation phytosanitaire de l'UE. Elle peut être présente dans plusieurs espèces végétales ou produits végétaux et engendrer un danger pour toute l'UE. Une constatation en Belgique peut avoir des répercussions économiques considérables pour les horticulteurs et les négociants en plantes. La décision d'exécution 2015/789 de la Commission du 18 mai 2015 prévoit notamment que les États membres devraient établir des zones délimitées, consistant en une zone infectée et une zone tampon, et appliquer des mesures d'éradication. Dans ce cas, toutes les plantes hôtes dans un rayon de 100 m autour de chaque infection doivent être enlevées, quel que soit leur statut sanitaire. Les plantes hôtes sont toutes les plantes sensibles à *Xylella*. Une zone tampon de 10 km est instituée autour de la zone infectée dans laquelle les inspections et les enquêtes sont intensifiées. La zone délimitée ne peut être levée qu'après une non détection de *Xylella* pendant cinq ans. Entre-temps, aucun transport de plantes hôtes depuis et vers la zone tampon n'est autorisé. Il est possible de dévier de ces mesures en cas d'apparition isolée de *Xylella* dans des plantes récemment introduites dont tout indique qu'elles étaient infectées avant leur introduction et qu'elles peuvent facilement être éliminées. En plus, aucun vecteur porteur de la bactérie ne peut être détecté.

Depuis 2016, un passeport phytosanitaire est obligatoire pour toutes les espèces végétales dont on constate la présence de *Xylella* en UE. Cette obligation vaut pour tous les transports en Belgique et au sein de l'UE entre opérateurs professionnels et acquéreurs, entre autres, de plantes en pot, arbustes, arbres, plantes pour parterres et jardinières destinés au consommateur final, criées, centres de jardinage, marchés de matériaux de construction, jardins publics, espaces verts des communes, gestionnaires du patrimoine naturel et propriétaires de patrimoine immobilier. Les mesures ne sont pas d'application pour les semences et les produits finis tels que les fruits et les fleurs coupées. Cependant, un certain nombre de pays hors de l'UE ont considérablement renforcé leurs exigences d'importation pour les plantes et le matériel végétal en provenance de l'UE. Les plantules *in vitro* par exemple ne peuvent pas être exportées en Australie sans double contrôle (deux essais de détection de *Xylella*).

La décision d'exécution 2015/789, adapté par la décision d'exécution 2015/2471, contraint également chaque État membre à réaliser une surveillance sur son territoire. Celui-ci comprend principalement une inspection visuelle des espèces végétales spécifiques mais implique également des échantillonnages et des analyses. En plus, chaque État membre doit établir un plan d'urgence avec des actions à prendre en cas de constatation, des campagnes de sensibilisation destinées aux habitants, opérateurs agricoles, transporteurs internationaux et voyageurs sur la nature de *Xylella* et le risque que présente l'organisme pour l'UE. Toute personne qui soupçonne la présence de *Xylella* ou en a réellement connaissance doit informer l'autorité phytosanitaire (l'AFSCA en Belgique) sans délai et fournir toutes les informations pertinentes. Cette prise de conscience a déjà abouti à la détection de *Xylella* en Allemagne où la bactérie a été constatée dans un laurier rose appartenant à une personne privé. La plante était gardée pour hiverner dans une serre d'une petite pépinière en Saxe.

Il est clair qu'un travail d'analyse considérable est nécessaire pour la mise en œuvre de la législation. Étant donné que *Xylella* se déplace facilement dans le système vasculaire, la bactérie peut se retrouver partout dans la plante. Comme elle préfère résider dans les extrémités de la plante, l'analyse cible la détection de *Xylella* dans les pétioles et la nervure centrale des feuilles (photo 5A/B/C). Un maximum de 25 feuilles est traité par analyse. Il est approprié d'analyser plusieurs échantillons d'un lot de plantes quand il est connu que la bactérie réside habituellement dans ces plantes sans provoquer des symptômes, comme dans les caféiers.



*Xylella fastidiosa* est particulièrement difficile à cultiver sur milieu nutritif. C'est pourquoi la bactérie est d'abord détectée de manière moléculaire. Cette analyse est réalisée en TaqMan® real-time PCR (Harper *et al.*, 2010) sur le gène *rimM* qui contribue à la translation du 16S rRNA. Cet essai détecte toutes les souches de *Xylella fastidiosa*. Un résultat d'analyse négatif est rapporté comme l'absence de *X. fastidiosa* et l'analyse est clôturée. Un résultat d'analyse positif est communiqué comme présence présumée de *X. fastidiosa*. L'analyse est alors poursuivie par d'autres essais moléculaires, entre autres le code-barre *gyrB* (Rodrigues *et al.*, 2003) et la détermination de la variante (e.a. Hernandez-Martinez *et al.*, 2006). Un résultat positif de ces analyses confirme la présence de *Xylella fastidiosa*. L'analyse est alors poursuivie par la mise en culture sur BCYA (Buffered Charcoal Yeast Extract Agar) avec L-cystéine et pyrophosphate de fer (Janse *et al.*, 2012), à l'origine un milieu nutritif constitué pour l'isolement de *Legionella*. Généralement, la culture de *Xylella* demande 10 à 15 jours pour obtenir des colonies d'environ 1 mm. Cependant certaines souches exigent plus de 4 semaines pour leur isolement. Finalement, des colonies produisent des cultures pures dont le profil génétique est déterminé (analyse de ST). La souche est inoculée dans l'espèce végétale dont provient la bactérie, dans *Polygala myrtifolia* (plante indicatrice présentant rapidement des signes de maladie), dans *Catharanthus roseus* (Monteiro *et al.*, 2001) et dans *Nicotiana tabacum* SR1 (Francis *et al.*, 2008).



Figure 5A. Echantillon diagnostique de *Polygala myrtifolia* pour l'analyse de *Xylella fastidiosa*.



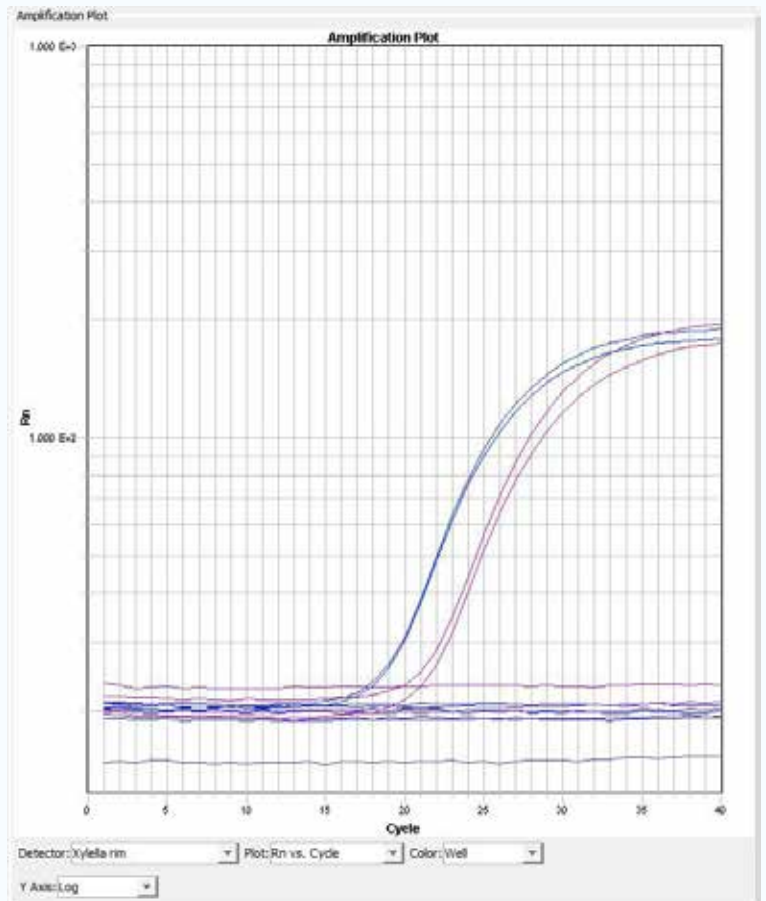


Figure 5B. Détection de *Xylella fastidiosa* dans l'essai rimM TaqMan PCR en temps réel. Le contrôle positif est marqué en double.

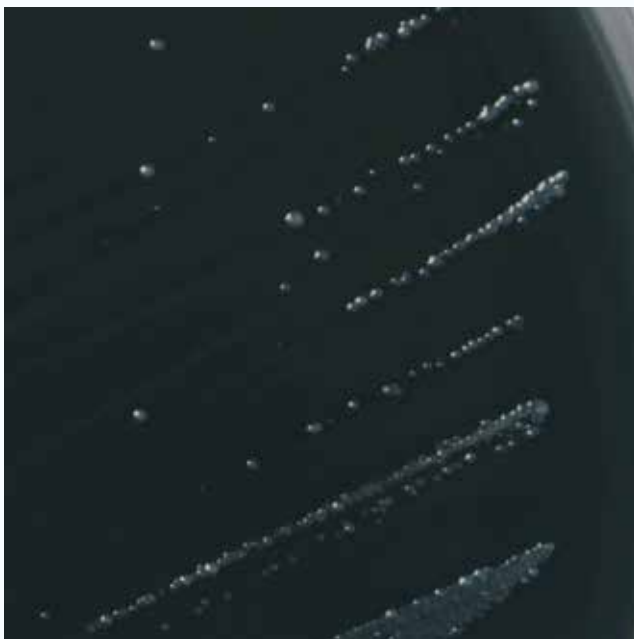


Figure 5C. Colonies de *Xylella fastidiosa* subsp. *fastidiosa* sur milieu BCYA après 14 jours à 28°C.

Cent ans après la première référence scientifique à une origine bactérienne du dessèchement des ceps de vignes de Californie (Pierce, 1892), la bactérie a été appelée *Xylella fastidiosa* (Wells *et al.*, 1987). *Xylella* fait référence au biotope spécifique de la bactérie dans la plante, le xylème. Le nom de l'espèce *fastidiosa* fait référence à la mise en culture difficile par les exigences nutritives fastidieuses. Par sa nature, la bactérie aime à vivre dans une entente apparente avec la plante. Cette entente est déstabilisée à partir du moment où l'équilibre dans le système du transport de l'eau dans la plante est perturbé. Cependant, *Xylella fastidiosa* peut aussi bien atteindre de nouvelles espèces végétales après une introduction accidentelle dans une nouvelle région. Si l'on peut prédire une chose au sujet de *Xylella*, c'est justement que la bactérie est imprévisible.



## Études citées:

- Amanifar et al., 2014. Isolation and pathogenicity of *Xylella fastidiosa* from grapevine and almond in Iran. *Phytopathologia Mediterranea* 53: 318–327.
- Andersen et al., 2007. Influence of xylem fluid chemistry on planktonic growth, biofilm formation and aggregation of *Xylella fastidiosa*. *FEMS Microbiology Letters* 274: 210–217.
- Bergsma et al., 2014. *Xylella fastidiosa* in *Coffea arabica* ornamental plants imported from Costa Rica and Honduras in the Netherlands. *Journal of Plant Pathology* 97: 395.
- Bosso et al., 2016. Shedding light on the effects of climate change on the potential distribution of *Xylella fastidiosa* in the Mediterranean basin. *Biological Invasions* DOI 10.1007/s10530-016-1118-1.
- Chen et al., 2014. Analyses of *Xylella* whole genome sequences and proposal of *Xylella taiwanensis* sp. nov. CDFA Pierce's Disease Control Program Research Symposium. p.92.
- Coletta-Filho et al., 2016. First report of olive leaf scorch in Brazil, associated with *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca*. *Phytopathologia Mediterranea* 55:
- EPPO Reporting Service 2015, n° 8. First report of *Xylella fastidiosa* in France, on the island of Corsica. Report 2015/144.
- EPPO Reporting Service 2015, n° 10. *Xylella fastidiosa* detected in Alpes-Maritimes, mainland France. Report 2015/180.
- Francis et al., 2008. Improved bioassay of *Xylella fastidiosa* using *Nicotiana tabacum* cultivar SR1. *Plant Disease* 92: 14-20.
- Güldür et al., 2005. First report of almond leaf scorch in Turkey. *Journal of Plant Pathology* 87: 246.
- Haelterman et al., 2015. First presumptive diagnosis of *Xylella fastidiosa* causing olive scorch in Argentina. *Journal of Plant Pathology* 97: 393.
- Harper et al., 2010. Development of LAMP and real-time PCR methods for the rapid detection of *Xylella fastidiosa* for quarantine and field applications. *Phytopathology* 100: 1282-1288.
- Jacques et al., 2016. New coffee plant-infecting *Xylella fastidiosa* variants derived via homologous recombination. *Applied and Environmental Microbiology* 82:1556–1568.
- Hernandez-Martinez et al., 2006. Differentiation of strains of *Xylella fastidiosa* infecting grape, almonds and oleander using a multiprimer assay. *Plant Disease* 90: 1382-1388.
- Hill & Purcell, 1997. Populations of *Xylella fastidiosa* in plants required for transmission by an efficient vector. *Phytopathology* 87: 1197-1201.
- Janse et al., 2012. Detection and identification methods and new tests as used and developed in the framework of cost873 for bacteria pathogenic to stone fruits and nuts. *Journal of Plant Pathology* 94: 147-154.
- Killiny & Almeida, 2009. *Xylella fastidiosa* afimbrial adhesins mediate cell transmission to plants by leafhopper vectors. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 521-528.
- Legendre et al., 2014. Identification and characterisation of *Xylella fastidiosa* isolated from coffee plants in France. *Journal of Plant Pathology* 96: 100.
- Leu & Su, 1993. Isolation, cultivation and pathogenicity of *Xylella fastidiosa*, the causal bacterium of pear leaf scorch in Taiwan. *Plant Disease* 77: 642-646.
- Loconsole et al., 2016. Intercepted isolates of *Xylella fastidiosa* in Europe reveal novel genetic diversity. *European Journal of Plant Pathology* : DOI 10.1007/s10658-016-0894-x
- Martelli et al., 2016. The olive quick decline syndrome in south-east Italy: a threatening phytosanitary emergency. *European Journal of Plant Pathology* 144: 235-243.
- Monteiro et al., 2001. *Catharanthus roseus*, an experimental host plant for the citrus strain of *Xylella fastidiosa*. *Plant Disease* 85: 246-251.
- Montero-Astúa et al., 2008. Isolation and molecular characterization of *Xylella fastidiosa* from coffee plants in Costa

- Rica. *Journal of Microbiology* 46: 482-490.
- Nascimento et al., 2016. The type II secreted lipase/esterase *LesA* is a key virulence factor required for *Xylella fastidiosa* pathogenesis in grapevines. *Sci. Rep.* 6, 18598; doi: 10.1038/srep18598
  - Newman et al., 2004. Cell–cell signaling controls *Xylella fastidiosa* interactions with both insects and plants. *PNAS* 101: 1737-1742.
  - Nunney et al., 2010. Population genomic analysis of a bacterial plant pathogen: novel insight into the origins of Pierce's disease of grapevine in the U.S. *PLoS One* 55:e15488.
  - Nunney et al., 2012. Detecting genetic introgression: high levels of intersubspecific recombination found in *Xylella fastidiosa* in Brazil. *Applied and Environmental Microbiology* 78:4702-4714.
  - Pierce, 1892. The California vine disease. A preliminary report of investigations. US Department of Agriculture. Division of Vegetable Pathology. Bulletin No.2.
  - Purcell et al., 1979. Pierce's disease bacterium: mechanism of transmission by leafhopper vectors. *Science* 206: 839-841.
  - Redak et al., 2004. The biology of xylem fluid-feeding insect vectors of *Xylella fastidiosa* and their relation to disease epidemiology. *Annual Review of Entomology* 49: 243–270.
  - Rodriguez et al., 2001. First report of *Xylella fastidiosa* infecting coffee in Costa Rica. *Plant Disease* 85:1027.
  - Rodrigues et al., 2003. Detection and diversity assessment of *Xylella fastidiosa* in field-collected plant and insect samples by using 16S rRNA and *gyrB* sequences. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 4249-4255.
  - Saponari et al., 2013. Identification of DNA sequences related to *Xylella fastidiosa* in oleander, almond and olive trees exhibiting leaf scorch symptoms in Apulia (Southern Italy). *Journal of Plant Pathology* 95: 668–668.
  - Saponari et al., 2014. New hosts of *Xylella fastidiosa* strain CoDiRO in Apulia. *Journal of Plant Pathology* 96: 603–611.
  - Scally et al., 2005. Multilocus Sequence type system for the plant pathogen *Xylella fastidiosa* and relative contributions of recombination and point mutation to clonal diversity. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 8491–8499.
  - Su et al., 2013. Pierce's disease of grapevines in Taiwan: isolation, cultivation and pathogenicity of *Xylella fastidiosa*. *Journal of Phytopathology* 161: 389-396.
  - Temsah et al., 2015. First report of *Xylella fastidiosa* associated with oleander leaf scorch in Lebanon. *Journal of Crop Protection* 4: 131-137.
  - Wells et al., 1987. *Xylella fastidiosa* gen.nov., sp.nov.: Gram-negative, xylem-limited, fastidious plant bacteria related to *Xanthomonas* spp. *International Journal of Systematic Bacteriology* 37: 136–143.
  - Zintzun, 2006. <http://nature.berkeley.edu/classes/es196/projects/2006final/zintzun%20.pdf>

johan.vanvaerenbergh@ilvo.vlaanderen.be



# La spectrométrie de mobilité ionique (IMS) : un soutien aux analyses de pesticides par screening

Laure Joly<sup>1</sup>, Séverine Gosciny<sup>1</sup>, Vincent Hanot<sup>1</sup>, Philippe Szternfeld<sup>1</sup>, Edwin De Pauw<sup>2</sup> et Gauthier Eppe<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ISP, Rue Juliette Wytsman 14, 1050 Bruxelles

<sup>2</sup>CART University of Liège, Allée de la Chimie 3, B-6c Sart-Tilman, B-4000 Liège, Belgique

## Introduction

Pendant de nombreuses années, seuls les laboratoires de chimie-physique construisant leurs propres instruments possédaient un appareil couplant la spectrométrie de mobilité ionique à la spectrométrie de masse (IMS-MS). C'est seulement depuis une dizaine d'années que des instruments IMS-MS ont fait leur apparition sur le marché, permettant l'acquisition de cet instrument par un plus grand nombre de laboratoires.

## Séparation de 2 isomères par IMS

Une chambre de mobilité ionique est une cellule contenant un gaz neutre à une pression contrôlée (~3 mbar) qui est soumise à un champ électrique. La mobilité ionique est le correspondant en phase gazeuse de l'électrophorèse : les ions sont à la fois accélérés dans le champ électrique et freinés par les nombreuses collisions avec le gaz-tampon.

Dans une cellule de mobilité ionique, un ion de conformation compacte arrivera plus rapidement au détecteur qu'un ion de conformation plus déployée.

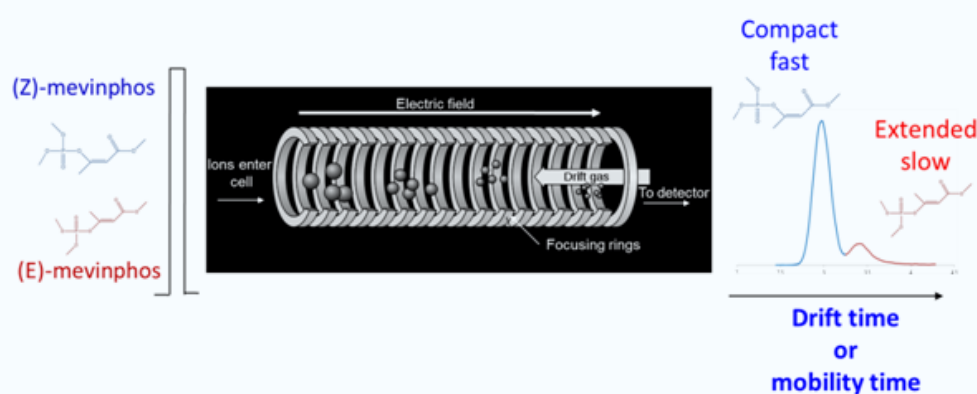


Figure 1 : Dans une cellule de mobilité ionique, 2 forces s'opposent : le champ électrique accélère les ions et le gaz tampon les ralentit par la force de friction. Le Z-mevinphos étant plus compact que le E-mevinphos, il traversera plus rapidement la cellule de mobilité ionique et arrivera le premier au détecteur.



Différents paramètres vont influencer la séparation des molécules : le type du gaz tampon (Dioxyde de carbone, Azote, Hélium), la pression dans la cellule de mobilité, le type de champs électrique (linéaire ou ondulaire) et la force du champs électrique. Un réglage adéquat de ces paramètres va permettre d'optimiser la séparation de conformations tridimensionnelles différentes, voire de molécules de même masse (isomères). La figure 1 montre que les isomères Z et E du mevinphos sont séparés grâce à la cellule de mobilité ionique. L'isomère Z-mevinphos est le plus compact, son temps de mobilité est plus petit que celui de l'isomère E-mevinphos ayant une conformation dans l'espace est plus étendue.

## Clean-up des spectres de masse « full scan » à l'aide de l'IMS

Dans la plupart des procédures de screening de routine, plusieurs centaines de pesticides sont analysés simultanément. Parallèlement, les étapes de purification sont réduites au minimum pour éviter la perte de composés. Les spectres full scan en résultant sont complexes. La présence de nombreux pics de matrice peut empêcher l'identification de composés analysés ayant une faible sensibilité ou une faible concentration. Par exemple, le pic de l'indoxacarb de masse 528,08 n'est quasiment pas visible dans le spectre MS (figure 2a).

Le spectre IMS-MS de la figure 2b montre comment la mobilité ionique décongestionne les spectres de masse et facilite les interprétations. Le pic de l'indoxacarb de masse 528,08 quasi inexistant du spectre MS (figure 2a) devient le pic le plus intense du spectre IMS-MS (figure 2b). L'IMS-MS augmente le niveau de confiance dans les résultats rendus.

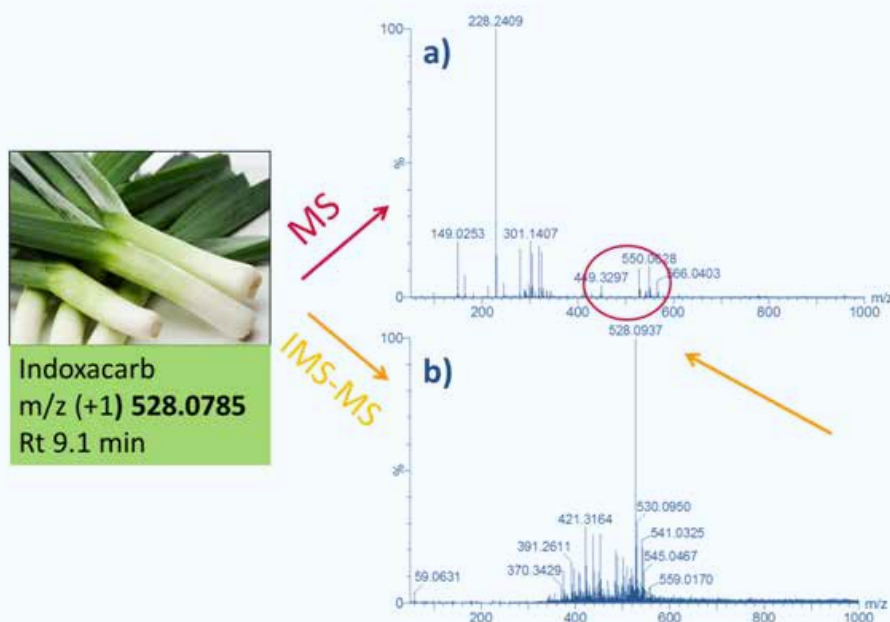


Figure 2 : Exemple de l'effet clean-up de la mobilité ionique pour l'indoxacarb dans le poireau : spectres de masse de type full scan obtenus en filtrant les données au temps de rétention de l'indoxacarb (a) et en filtrant les données au temps de rétention ET de mobilité de l'indoxacarb (b)



## La mobilité ionique comme un point d'identification supplémentaire

Les méthodes de screening conventionnelles identifient les pesticides grâce à 2 points d'identification : leur temps de rétention et leur masse. La séparation par mobilité ionique apporte une dimension de séparation complémentaire à la masse et au temps de rétention. Le temps de mobilité peut être considéré comme un point d'identification supplémentaire. Ceci permet de réduire les cas de faux positifs et/ou de faux négatifs.

La fiabilité de ce nouveau paramètre a été démontrée, les temps de mobilité présentent une bonne reproductibilité, sont indépendants des concentrations et de la matrice analysée. Le temps de mobilité ionique est un paramètre physique supplémentaire pour aider à l'identification et augmenter la confiance dans les résultats rendus.

## Conclusion

Cet article est un aperçu de l'usage qui peut être fait de la mobilité pour l'analyse de pesticide par screening. Cette technologie performante pourra être appliquée dans le futur aux analyses par screening multi-résidus des pesticides dans les denrées alimentaires.

## Quelques lectures pour aller plus loin :

- V. Gabelica, *Intérêt de la spectrométrie de mobilité ionique pour l'étude de la conformation et des assemblages non-covalents de biomolécules*, *Spectra Analyse* n°251, Septembre-Octobre 2006
- S. Goscinny, L. Joly, E. De Pauw, V. Hanot, G. Eppe, *Travelling-wave ion mobility time-of-flight mass spectrometry as an alternative strategy for screening of multi-class pesticides in fruits and vegetables*, *Journal of Chromatography A*, 1405 (2015) 85-93

laure.joly@wiv-isp.be

# Organisation et résultats de Tests d'Aptitude sur les méthodes analytiques multi-mycotoxines

*Philippe Debongnie, Emmanuel K. Tangni, Bart Huybrechts et Alfons Callebaut*

*Centre d'Etudes et de Recherches vétérinaires et agrochimiques (CODA-CERVA)*

*Direction opérationnelle Sécurité chimique de la chaîne alimentaire,*

*Service Toxines et Substances naturelles*

*Laboratoire national de référence pour les Mycotoxines*

*Leuvensesteenweg 17, 3080 Tervuren, Belgique*

## Introduction

Dans le domaine de la santé et la sécurité alimentaire, des résultats fiables sont essentiels non seulement pour la recherche, mais aussi pour appliquer la législation, pour assurer la qualité et la sûreté des aliments, pour les bases de données utilisées par exemple l'analyse de risques, et pour rendre possibles les transactions internationales.

Chaque laboratoire d'essai doit donc valider ses méthodes analytiques et démontrer la fiabilité des résultats qu'il fournit. La meilleure démonstration, d'ailleurs indispensable pour l'accréditation, est l'obtention de bons résultats lors de "tests d'aptitude" ou "proficiency tests" (PT). Un PT est un exercice dans lequel un certain nombre de laboratoires reçoivent un ou plusieurs échantillons dont ils mesurent et rapportent la concentration d'un ou de plusieurs analytes. L'organisateur compile alors les résultats et calcule pour chacun un "z-score", qui est une mesure de l'écart entre ce résultat et la concentration "vraie".

Le laboratoire doit également être capable de fournir et démontrer une estimation fiable de l'incertitude sur ses résultats. Dès lors, certains organisateurs de PT, notamment les Laboratoires de Référence Européens (European Reference Laboratories, EU-RL), calculent également le "z-score", qui est une mesure de la fiabilité de la déclaration complète du laboratoire, incluant l'estimation de l'incertitude de mesure étendue ("Extended Measurement Uncertainty",  $MU_{(k=2)}$ ), c-à-d. l'intervalle de confiance à 95% autour du résultat. Par exemple, si la concentration vraie est  $99 \mu\text{g}/\text{kg}$ , alors " $120 \pm 24 \mu\text{g}/\text{kg}$ " est correct et obtient un z-score satisfaisant, alors que " $115 \pm 5 \mu\text{g}/\text{kg}$ " est trompeur et obtient z-score insatisfaisant, même si le résultat lui-même est plus proche de la concentration vraie.

Dans l'Union Européenne, pour chaque domaine du contrôle de la sécurité alimentaire, dont les mycotoxines et les éléments-traces, une des tâches des Laboratoires Nationaux de Référence (LNR) est d'organiser des PT auxquels les laboratoires accrédités par l'AFSCA doivent participer, et une des tâches des EU-RL est d'organiser des PT auxquels les LNR doivent participer.

Le service Toxines et Substances Naturelles du CODA-CERVA est LNR pour les mycotoxines et organise donc des PT pour les laboratoires agréés. Une synergie fructueuse a été développée entre cette activité et deux autres spécialités du service, le développement de méthodes analytiques multi-mycotoxines par chromatographie couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) et la production, en collaboration avec la Mycothèque de l'Université catholique de Louvain (UCL), de matériaux contaminés "naturellement", utilisés comme matériaux de



référence ou pour des expériences sur animaux. Cette expertise combinée a permis au CODA-CERVA d'organiser des PT qui sont très utiles pour le nombre croissant de laboratoires de recherche ou de contrôle qui adoptent des méthodes de ce type. A côté de la dizaine de laboratoires agréés, chaque année depuis 2012, vingt à quarante autres laboratoires des 5 continents participent à ces PT.

Les calculs et les critères appliqués aux résultats des PT sont basés sur le texte de référence "International harmonized protocol for the proficiency testing of analytical chemistry laboratories" (IUPAC, Pure Appl. Chem., Vol. 78, No. 1, pp. 145–196, 2006).

L'article ci-dessous décrit plus en détail comment les PT sont organisés et comment leurs résultats sont traités et rapportés, et quels types d'informations ces résultats fournissent, pour les participants et pour l'observation de tendances générales de l'évolution des performances analytiques.

## Matériaux

Des grains de diverses céréales sont inoculés avec des souches de moisissures sélectionnées à la Mycothèque de l'UCL. Après croissance des moisissures, les grains sont stérilisés, broyés et homogénéisés. Différents matériaux de ce type, chacun riche en un groupe de mycotoxines différent, sont mélangés avec une farine de céréale 'blanche'. Le matériau final, réparti en échantillons de 55 grammes, contient les 11 mycotoxines pour lesquelles l'UE a établi des teneurs maximales dans les céréales, plus d'autres mycotoxines pour lesquelles il n'existe pas de réglementation européenne (p.ex. acétyl-DON, nivalénol, enniatines, ...).

En dehors des céréales, des matériaux de référence sont également préparés pour d'autres types de matrices : suppléments alimentaires, cacao, etc.

## Valeurs Assignées

La "valeur conventionnelle" ou "valeur assignée" ( $V_{ass}$ ) est la moyenne robuste des résultats des participants, après élimination des "résultats aberrants" ("outliers"). L'"incertitude standard" de la valeur assignée ( $u_{V_{ass}}$ ) est la déviation standard robuste des résultats retenus, divisée par la racine carrée du nombre de ces résultats. L'intervalle de confiance à 95% ou "incertitude étendue" est l'incertitude standard  $u_{V_{ass}}$  multipliée par un "facteur k" de 2.

## z-scores

Le z-score est calculé pour chaque résultat ( $X_{lab}$ ) en comparant l'écart ( $X_{lab} - V_{ass}$ ) avec la "déviatoin standard cible pour le test d'aptitude" ( $\sigma_p$ ):

$$Z = (X_{lab} - V_{ass}) / \sigma_p$$

Ces z-scores sont considérés comme :

"satisfaisants" si entre -2 et +2 ;

"discutables" si entre -3 et -2 ou entre +2 et +3 ;

"insatisfaisants" si plus bas que -3 ou plus hauts que +3.



Dans l'hypothèse d'une distribution "normale" ("gaussienne"), les pourcentages de résultats discutables et insatisfaisants devraient être d'environ 5% et 0,25%, respectivement. En d'autres mots, un laboratoire aux performances moyennes peut s'attendre à obtenir environ 5% de z-scores discutables, mais seulement 0,25% d'insatisfaisants. Un z-score insatisfaisant doit être suivi par une recherche de ses causes et par des actions correctives appropriées.

## Déviations standard cibles ( $\sigma_p$ )

Les valeurs des z-scores dépendent fortement de la déviation standard cible,  $\sigma_p$ . Cette  $\sigma_p$  est souvent calculée à partir de  $V_{ass}$  à l'aide de l'équation empirique de Horwitz-Thompson (fig. 1). Horwitz, après avoir compilé les résultats d'un très grand nombre de PT, a trouvé que le principal facteur influençant les déviations standard inter-laboratoires était la concentration en analyte et a proposé la fonction empirique suivante pour décrire les données observées :

$$RSD_{(\%)} = 2^{(1-0,5\log c_{(g/g)})}$$

Plus tard, Thompson a modifié cette équation en fixant une déviation standard relative (RSD) maximale de 22% pour les faibles concentrations ( $\leq 120 \mu\text{g}/\text{kg}$ ). La raison de ceci est que, avec une RSD beaucoup plus élevée que 22%, l'intervalle de confiance à 95% autour des résultats ( $\pm \text{MU} = \pm 2 \text{RSD}$ ) serait tellement large que ces résultats seraient peu utiles, et que donc en pratique des efforts, investissements et coûts supplémentaires sont d'habitude acceptés pour garder cet intervalle de confiance dans des limites utiles.

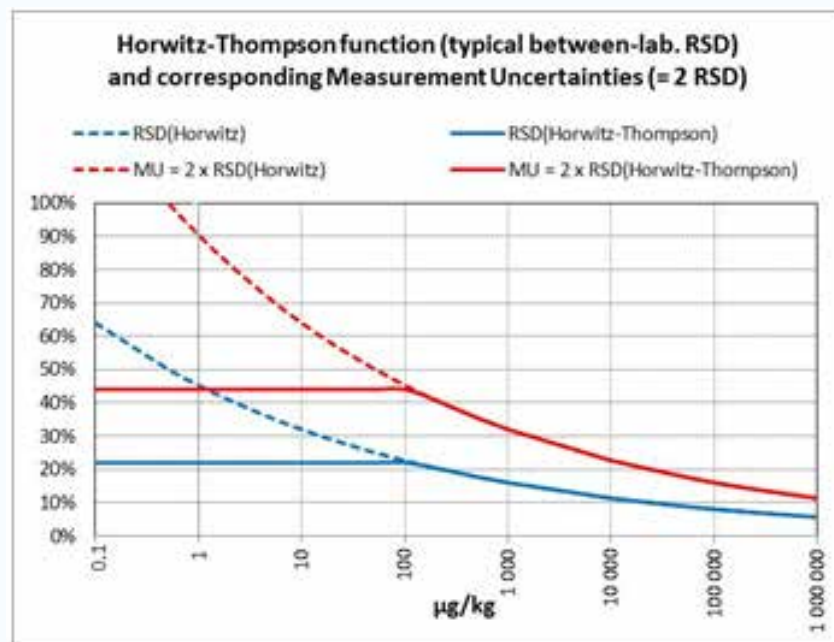


Figure 1: Horwitz-Thompson functie – Fonction de Horwitz-Thompson

## Zeta-score ( $\zeta$ )

Beaucoup, même parmi les chimistes analytiques eux-mêmes, trouvent difficile d'admettre que des intervalles de confiance de  $\pm 44\%$  soient normaux pour de faibles concentrations. Une conséquence est une forte tendance des laboratoires à sous-estimer leurs incertitudes de mesure, surtout quand ils sont en compétition avec d'autres pour des parts de marché ou pour leur réputation.

Ceci est une des raisons de calculer le "z-score", dans lequel on compare l'écart ( $X_{\text{lab}} - V_{\text{ass}}$ ) non pas avec  $\sigma$  mais avec l'incertitude standard ( $u_{\text{lab}} = MU_{\text{lab}} / 2$ ) annoncée par le laboratoire (combinée avec l'incertitude standard sur la valeur assignée elle-même) :

$$\zeta = (X_{\text{lab}} - V_{\text{ass}}) / \sqrt{u_{\text{lab}}^2 + u_{V_{\text{ass}}}^2}$$

Les  $\zeta$ -scores sont considérés satisfaisants, discutables ou insatisfaisants sur base des mêmes critères que pour les z-scores.

## Exemple détaillé : aflatoxine B1 dans le PT de 2014

Les participants ont été priés de rapporter les résultats pour 2 sous-échantillons. Au total, 47 résultats ont été reçus, dont 46 effectivement en double. Deux résultats étaient "censurés à droite", c.-à-d. au-dessus des limites de rapportage habituelles des deux participants.

La médiane de tous les résultats,  $MED_{\text{tot}}$ , était  $22,32 \mu\text{g}/\text{kg}$ , légèrement plus élevée que la teneur maximale pour les matières premières des aliments pour animaux ( $20 \mu\text{g}/\text{kg}$ , dir. 2003/100/CE). Cinq résultats étaient en-dehors de l'intervalle  $[MED_{\text{tot}} \pm 50\%]$  et ont été considérés comme "outliers". La médiane des 40 résultats restant était  $22,34 \mu\text{g}/\text{kg}$ .

Des "Kernel density plots" (fig. 2) ont été utilisés pour vérifier visuellement la distribution des résultats non censurés, avant et après élimination des outliers (courbes rouge et bleue respectivement).

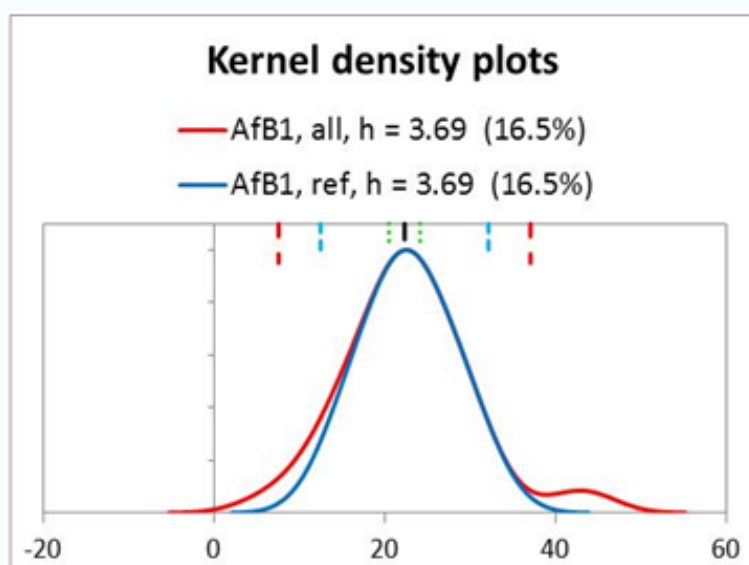


Figure 2: Graphique de noyau de la densité avant et après élimination des outliers (respectivement en rouge et bleu)

La déviation standard robuste  $\sigma_{rob}$  (médiane des valeurs absolues des écarts des 40 résultats par rapport à  $V_{ass}$ ) était 5,77  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (25,8%). Le rapport entre cette déviation standard et celle attendue sur base de l'équation de Horwitz-Thompson ("HorRat" =  $\sigma_{rob} / \sigma_p$ ) était 1,17, sous le maximum (1,2) recommandé par l'IUPAC.

Tous les critères étaient donc remplis pour donner à  $MED_{ref}$  le statut de valeur assignée, et pour assigner des z- et  $\zeta$ -scores aux résultats des participants.

La figure 3 donne les résultats en  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , triés par ordre croissant. La forme sigmoïdale est typique. Les lignes horizontales indiquent  $V_{ass}$  et les intervalles suivants autour de  $V_{ass}$  :  $\pm u_{V_{ass}} \pm 2 \sigma_p$  et  $\pm 3 \sigma_p$ . Les 39 résultats entre les deux lignes vertes sont satisfaisants, les 3 résultats entre les lignes vertes et les rouges sont discutables et les 3 résultats au-delà des lignes rouges sont insatisfaisants. Les 2 résultats censurés à droite sont aussi inclus dans le graphique : il avait été demandé aux participants, au cas où leurs résultats tombaient en-dehors de leur domaine de rapportage habituel, de donner leur limite de rapportage (croix rouge dans le graphique) mais aussi leur résultat brut (tiret rouge dans le graphique). Dans le cas présent, ces deux résultats sont corrects et auraient obtenus des z-scores satisfaisants (-1,8 et 0,2).

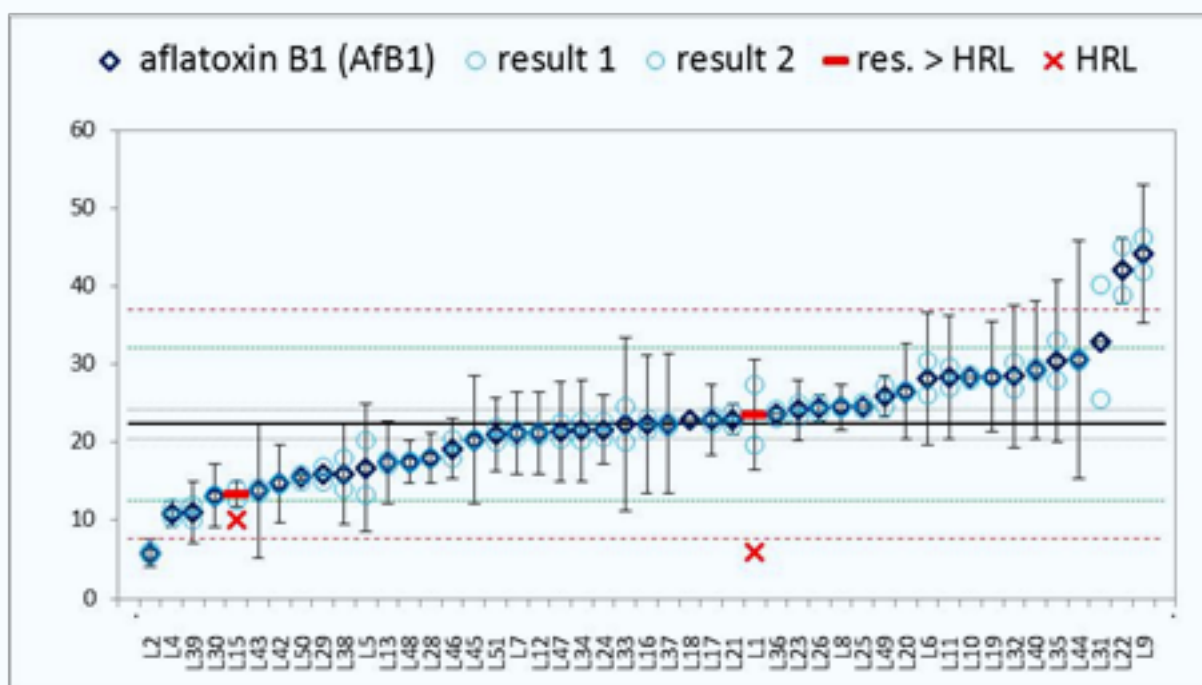


Figure 3: Résultats des laboratoires pour l'aflatoxine B1

La figure 4 montre les z-scores et les  $\zeta$ -scores. Pour les z-scores, la différence avec la figure 3 revient à un simple changement d'axe Y. Mais les  $\zeta$ -scores donnent une image bien différente : la plupart sont plus élevés (en valeur absolue) que les z-scores correspondants, et 7 sont insatisfaisants. Ceci est une observation commune dans les PT, et montre la tendance, largement répandue parmi les laboratoires, de sous-estimer leur incertitude de mesure.



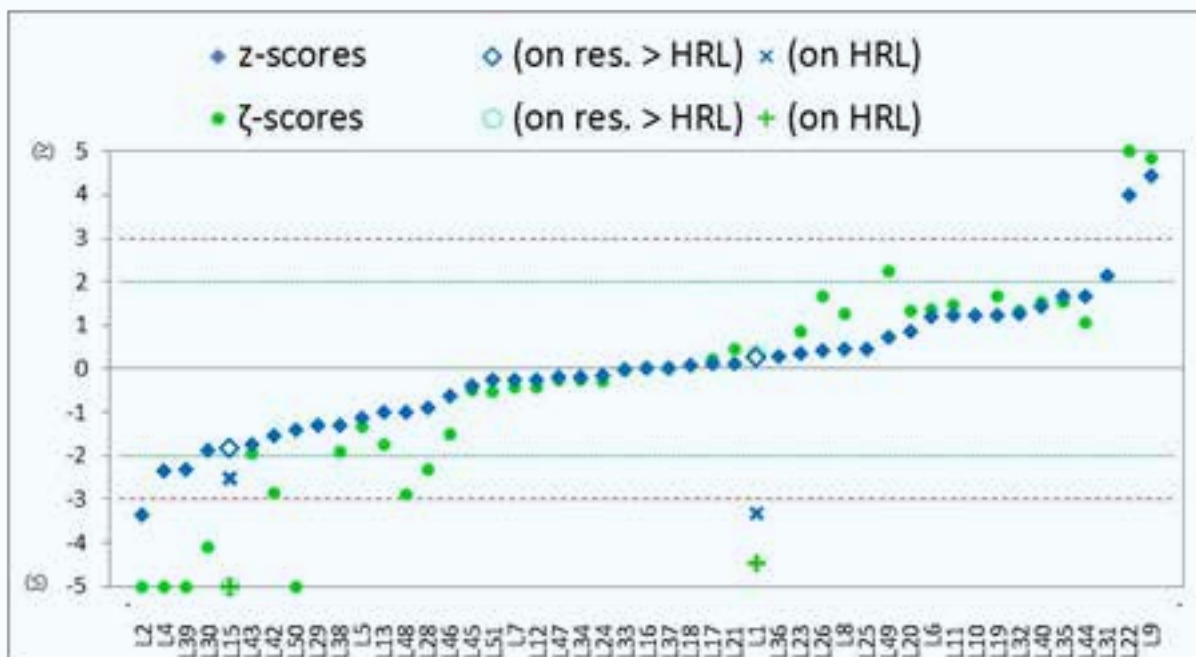


Figure 4: Z-scores et  $\zeta$ -scores des laboratoires

## Tendances liées aux methods ou aux instruments

Il est aussi demandé aux participants de fournir quelques détails sur les méthodes analytiques et les instruments utilisés. L'objectif est de rechercher de possibles influences des méthodes ou des instruments sur la distribution des résultats.

En 2014, par exemple, une différence a été observée pour l'aflatoxine G2. La concentration en AfG2 était très faible ( $< 2 \mu\text{g}/\text{kg}$ ), et sous les limites de rapportage de nombreux participants. Dans la figure 5, les symboles "boîte-à-moustache" ("box-and-whiskers") représentent les percentiles 0-25-50-75-100 de la distribution des résultats non censurés pour quatre groupes de méthodes analytiques. Les 5 résultats obtenus après purification des extraits par immuno-affinité ("IAC") étaient plus bas que les 14 résultats obtenus sans purification ou avec une autre méthode de purification.

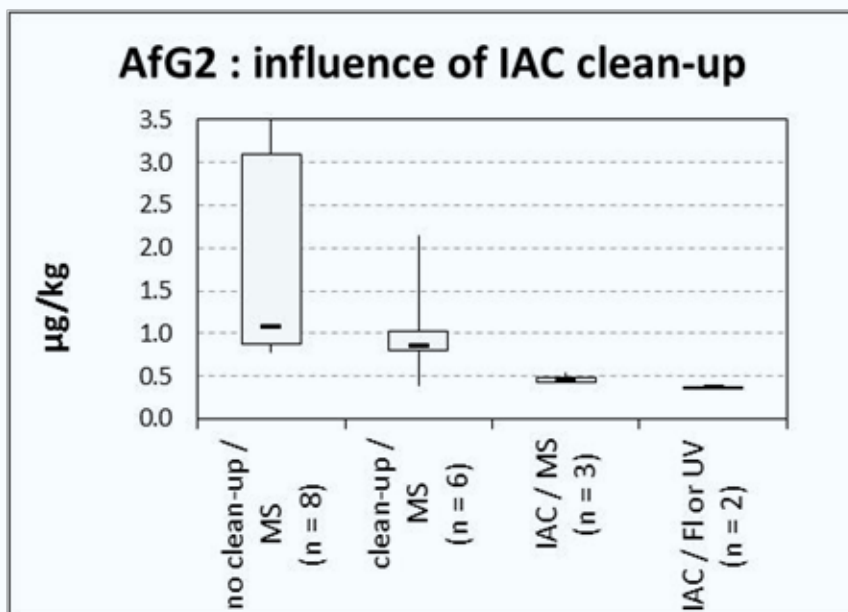
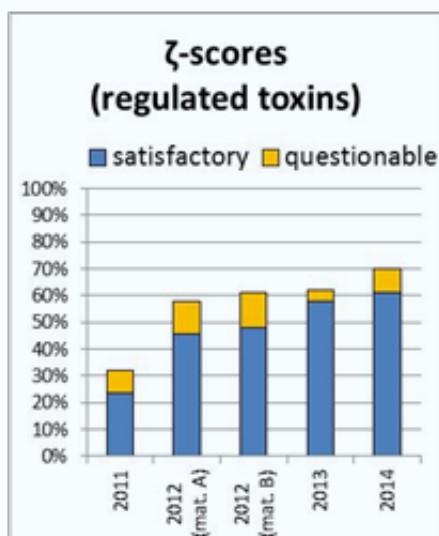
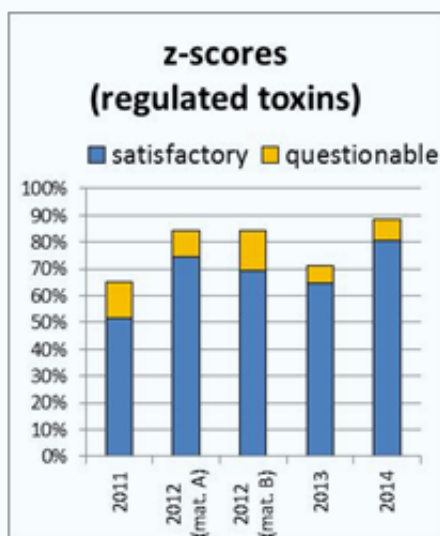


Figure 5: Représentation graphique "box-and-whiskers" des résultats obtenus pour les 4 groupes de méthodes analytiques

## Tendances générales

Les pourcentages de z-scores et  $\zeta$ -scores satisfaisants n'atteignent pas les 95% attendus pour une distribution gaussienne (fig. 6 and 7). Pour les z-scores, ceci est dû surtout à la présence d'outliers (seuls les non-outliers ont des distributions approximativement gaussiennes). Pour les  $\zeta$ -scores, une cause additionnelle est le nombre de participants qui sous-estiment leur incertitude de mesure.

Cependant, la situation s'améliore avec le temps : les pourcentages de z- et de  $\zeta$ -scores satisfaisants tendent à augmenter, grâce à une diminution du nombre d'outliers et à des estimations progressivement plus réalistes des incertitudes de mesure.



Figures 6 et 7: Pourcentages de z-score et de  $\zeta$ -scores satisfaisants au cours des années

Bart.Huybrechts@coda-cerva.be



# Détection simultanée de dix familles d'antibiotiques dans la viande par cytométrie de flux

Anne-Catherine HUET

CER Groupe – Département Santé, Rue du Point du Jour 8, 6900 Marloie, Belgique

## Introduction

L'utilisation vétérinaire abusive d'antibiotiques peut mener à la présence de résidus dans les denrées alimentaires, ce qui représente un risque pour les consommateurs. Certains antibiotiques peuvent générer des réactions allergiques ou toxiques. De plus, cet usage excessif a conduit à une augmentation de la résistance des bactéries ainsi qu'à l'émergence de nouvelles souches. L'Union Européenne a fixé pour plusieurs antibiotiques des Limites Maximales de Résidus (LMR) pour réglementer leur utilisation (Commission Regulation EU N°37/2010). On encourage également un usage raisonné des antibiotiques en production animale.

Différentes méthodes de screening ont été mises au point pour détecter la présence éventuelle de résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires principalement. Les plus connues sont les suivantes : les tests d'inhibition microbiologique, les ELISAs et les tests immuno-chromatographiques. La plupart de ces tests rapides détectent soit uniquement des substances appartenant à une seule famille d'antibiotiques, soit un nombre limité de substances de plusieurs familles. Pour l'identification de la(des) famille(s) présente(s) dans la matrice il est généralement nécessaire de réaliser plusieurs tests en parallèle par échantillon.

Dans le cadre d'un projet en partenariat avec Unisensor SA, nous avons développé une méthode de screening capable de détecter simultanément un grand nombre d'antibiotiques dans la viande tout en permettant la distinction des familles présentes. Notre choix s'est porté sur la cytométrie de flux basée sur un dosage immunologique.

## Méthode de détection et ses performances

Trois éléments sont essentiels pour la méthode développée :

- i) des microparticules fluorescentes individuellement encodées par leur combinaison spécifique de taille et d'intensité de fluorescence. Ces billes représentent le support solide pour la réalisation de tests compétitifs, avec un antibiotique ou un dérivé différent fixé en surface. Ce qui permet l'identification de chaque famille.
- ii) des biomolécules spécifiques ou génériques tels que des anticorps, des récepteurs, ... dirigés contre les antibiotiques et les microbilles fluorescentes. En présence d'antibiotiques dans l'échantillon, les ligands vont entrer en compétition entre ces résidus en suspension et les antibiotiques (ou leurs dérivés) immobilisés sur les microparticules.
- iii) des reporteurs fluorescents qui assurent la révélation du dosage.



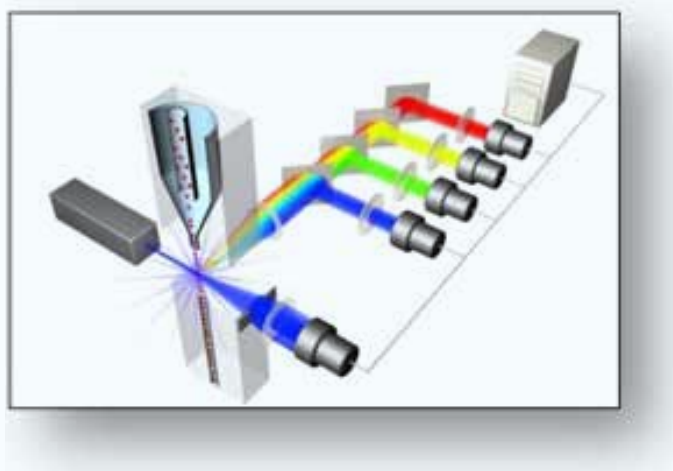


Figure 1 : principe du cytomètre de flux composé d'un laser qui excite les reporteurs fluorescents liés à la surface des microsphères et des détecteurs qui captent la fluorescence émise

Puisqu'il s'agit d'un dosage de type compétitif, la présence de résidu(s) cible(s) est révélée par une diminution de signal pour la(les) bille(s) correspondante(s) par rapport à l'intensité de fluorescence d'un échantillon blanc.

A) **Absence** of antibiotic in the sample



B) **Presence** of antibiotic in the sample

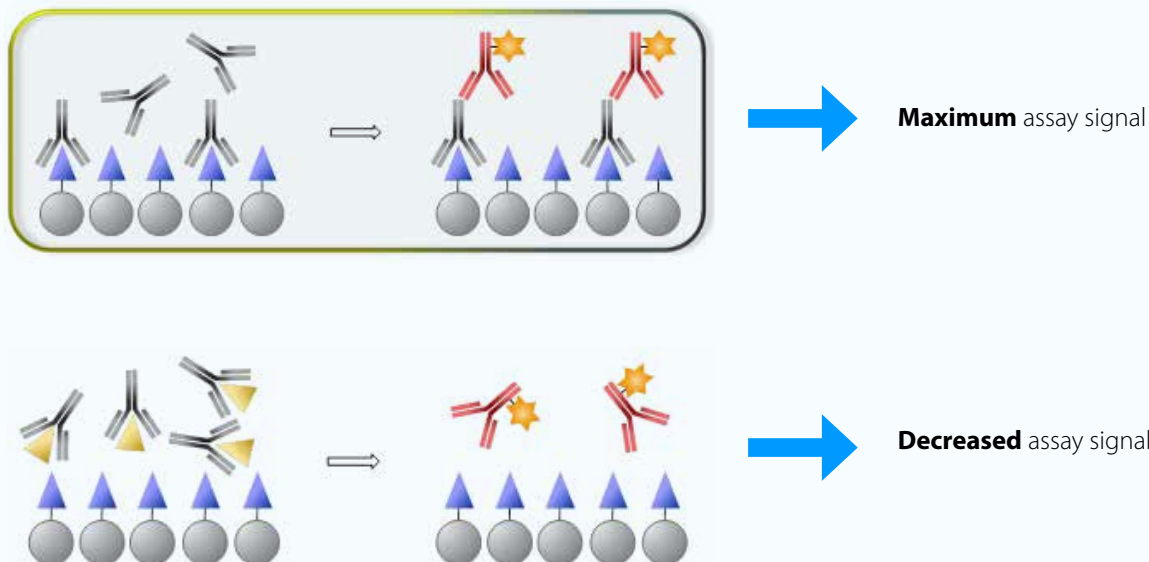


Figure 2 : principe de l'immunoassay utilisé dans cette méthode

Nous avons également relevé le défi de mettre au point une méthode d'extraction simple et commune pour 10 familles d'antibiotiques tout en respectant les LMRs établies; sachant que les caractéristiques physico-chimiques des antibiotiques peuvent s'avérer très différentes.



## Conclusion

Le CER Groupe et Unisensor SA ont développé une méthode rapide capable de détecter dans la viande simultanément 10 familles d'antibiotiques grâce à la cytométrie de flux. Ce qui représente plus de 80 substances individuelles appartenant à ces différentes familles : Tétracyclines,  $\beta$ -Lactames, Sulfonamides, Phénicolés, (Fluoro)quinolones, Macrolides, Aminoglycosides, Polymyxines, Pleuromutilines et Lincosamides. Un kit BEADYPLEX™ est en cours de commercialisation par Unisensor SA. Ce développement fait suite aux demandes de l'industrie agroalimentaire qui cherche des moyens de plus en plus exigeants en termes de rapidité d'analyse, de coût, de précision sur la mesure, de sélectivité des molécules analysées, d'automatisation pour une grande série d'échantillons, et surtout de diversité de contaminants pouvant être dépistés simultanément dans un seul échantillon.

Tableau 1 : Résumé des informations relatives au BEADYPLEX™ utilisé dans la viande de porc

Antibiotic family	Representative antibiotic	MR(P)L (ng/g)	Screening target concentration (ng/g)	Number of detected antibiotics
Aminoglycoside	Streptomycin	500	250	8
	Gentamicin	50	50	
Polymyxin	Colistin	150	150	2
Lincosamide	Lincomycin	100	25	2
Tetracycline	Oxytetracycline	100	50	9
Sulfonamide	Sulfadimidine	100	100	18
Macrolide	Spiramycin	250	250	5
	Tildipirosin	1200	1200	
Phenicol	Thiamphenicol	50	100	3
$\beta$ -Lactam	Cefquinome	50	50	18
(Fluoro)quinolone	Marbofloxacin	150	20	15
Pleuromutilin	Valnemulin	50	50	2

Pour plus d'informations :  
[infolnr@cergrroupe.be](mailto:infolnr@cergrroupe.be) - [celia.suarez@unisensor.be](mailto:celia.suarez@unisensor.be)

# Le séquençage complet du génome pour aider les laboratoires de contrôle dans le développement de méthode de détection ciblant un *Bacillus subtilis* génétiquement modifié non-autorisé en UE, surproduisant la riboflavine.

*Sigrid De Keersmaecker, Nina Papazova et Nancy Roosens*

*Institut Scientifique de Santé Publique (WIV-ISP), Plateforme de Biotechnologie et Biologie Moléculaire (PBB), rue J. Wytsmanstraat 14, 1050 Bruxelles, Belgique*

En septembre 2014, la présence d'une bactérie génétiquement modifiée (GM) de *Bacillus subtilis* surproduisant la vitamine B2 (riboflavine) dans un additif alimentaire pour bétail importé de Chine dans le marché UE a été notifiée par le Système d'Alerte Rapide pour l'alimentation humaine et animale (RASFF 2014–1249). Cette notification RASFF a mis en évidence qu'une contamination par un micro-organisme génétiquement (GMM) pouvait avoir lieu dans la chaîne alimentaire UE. De plus, aucune méthode de détection pour ce GMM n'était disponible ni même aucune stratégie n'était développée pour détecter ce type de contamination par les laboratoires de contrôle.

C'est pourquoi, l'Institut Scientifique de Santé Publique a utilisé le séquençage complet du génome (plateforme Illumina HiSeq2500 avec une couverture de 350 X) sur le GMM isolé (figure 1) afin de générer les informations de séquences séquence nécessaire pour développer une méthode spécifique de détection.



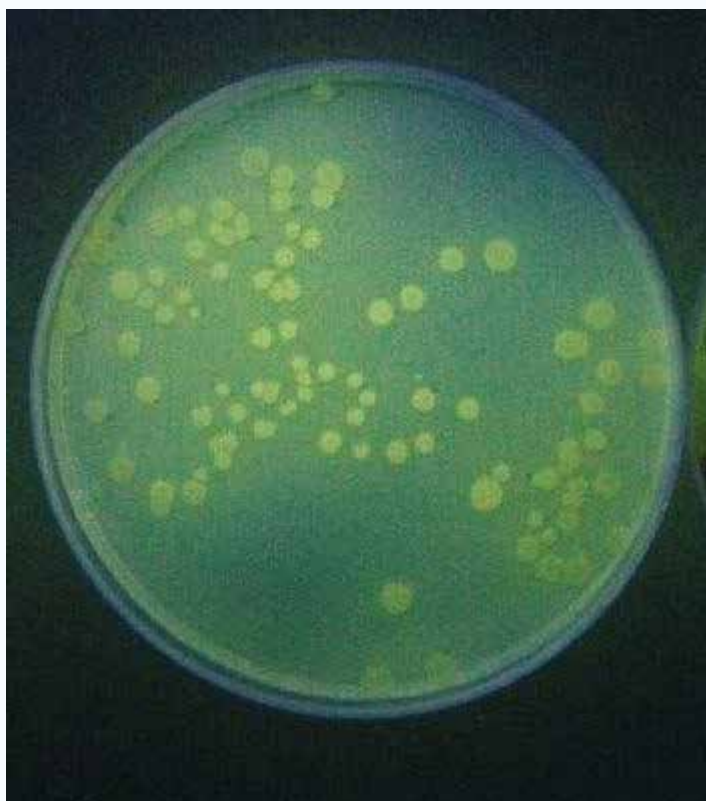


Figure 1 : Bactérie GM de *Bacillus subtilis* isolée surproduisant le vitamine B2 utilisée pour le séquençage complet du génome (RASFF 2014–1249)

En bref, les “reads” de séquençage ont été assemblées « de novo » en utilisant l’option “De novo assembly” de la version 7.5.1 de CLC Genomics Workbench (CLC Bio) en fragments plus grands appelés « scaffolds ». Les données générées ont été analysées en utilisant une simple approche “BLAST” dans le but de récupérer les fragments de séquence contenant l’opéron de biosynthèse de la riboflavine. Les fragments isolés ont été utilisés pour désigner une nouvelle méthode qPCR TaqMan® (appelée “VitB2-UGM”), ciblant la jonction entre l’opéron riboflavine de *B. subtilis* et le vecteur utilisé pour construire cette bactérie GM surproduisant le vitamine. La méthode a été développée en accord avec les exigences UE pour la performance de méthode qPCR pour la spécificité, sensibilité, l’efficacité PCR et la répétabilité. Cette méthode qPCR “VitB2-UGM” qPCR est capable de détecter une bactérie de *B. subtilis* dans de l’ADN génomique extrait d’additif alimentaire, sans étape de culture préalable.

Cette méthode qPCR développée a fourni au laboratoire de contrôle un outil crucial pour identifier spécifiquement et rapidement cette bactérie GM non-autorisée dans l’alimentation humain et pour animal. Cette méthode est actuellement utilisée par le WIV-ISP (GMOLAB, PBB) sur des échantillons de routine afin de contrôler les additifs alimentaires pour animaux pour l’AFSCA.

Cette étude démontre que les données issues du séquençage complet du génome peuvent donner un accès à des informations cruciales de séquences nécessaires pour développer des méthodes qPCR spécifiques pour détecter les OGM inconnus ou non-autorisés dans les additifs destinés à la consommation humaine ou animale.

Les GMM sont connus pour être massivement utilisés afin de produire les additifs destinés à la consommation humaine ou animale et en accord avec la législation UE (EC No 1333/2008, 1331/2008), les additifs destinés à la consommation humaine ou animale and produits par les GMM doivent être exempts, à la fois, de GMM (vivant ou mort) et de gènes nouvellement introduits. Actuellement, aucun contrôle systématique n'est réalisé sur le marché et la question est posée s'il n'est pas nécessaire de mettre en place une surveillance plus systématique du marché UE pour les GMM) dans les additifs destinés à la consommation humaine ou animale, ainsi que de développer des stratégies plus appropriées.

Ce texte est basé sur deux publications scientifiques publiées par le WIV-ISP:

- *Barbau-Piednoir E, De Keersmaecker SCJ, Wuyts V, Gau C, Pirovano W, Costessi A, Philipp P, Roosens NH. Genome sequence of EU-unauthorized genetically modified Bacillus subtilis strain 2014-3557 overproducing riboflavin, isolated from a vitamin B2 80% feed additive- 531. Genome Announcements (2015); 3(2): e00214-15 DOI: 10.1128/genomeA.00214-15*
- *Barbau-Piednoir E, De Keersmaecker SCJ, Delvoe M, Gau C, Philipp P, Roosens NH. Use of Next Generation Sequencing data to develop a qPCR method for specific detection of EU-unauthorized genetically modified Bacillus subtilis overproducing riboflavin. BCM biotechnol (2015); / DOI: DOI: 10.1186/s12896-015-0216-y*

Nancy.Roosens@wiv-isp.be



# Workshops & Symposia

**Les formations, destinées aux laboratoires agréés, organisées par l'AFSCA en collaboration avec les laboratoires nationaux de référence se trouvent sur le site web de l'AFSCA ([www.afsca.be](http://www.afsca.be) > Professionnels > Laboratoires > Séminaires & workshop).**

**Ce tableau est régulièrement actualisé, veuillez donc régulièrement consulter le site web.**

**D'autres workshops et symposia intéressants sont mentionnés ci-dessous.**

Date	Sujet	Lieu	Plus d'infos (site web)
28.08-01.09.2016	The 32nd Symposium of the European Society of Nematologists	Braga, Portugal	<a href="http://esn2016braga.om">http://esn2016braga.om</a>
28.08-02.09.2016	The 36th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants – Dioxin 2016	Firenze, Italy	<a href="http://www.dioxin2016firenze.org/">http://www.dioxin2016firenze.org/</a>
7-9.09.2016	IDF Mastitis Conference 2016	Cité des Congrès, Nantes, France	<a href="http://www.idfmastitis2016.com/en/">http://www.idfmastitis2016.com/en/</a>
9.09.2016	kant-en-klaargerechten: lekker en gezond?	Leuven, Brussels	Organised by the Flemish Chemical Society – Food section <a href="http://www.kvcv.be/index.php/nl/secties/sectie-voeding">http://www.kvcv.be/index.php/nl/secties/sectie-voeding</a>
12.09.2016	INSECTA® 2016 International Symposium on Insects as Feed, Food and Non-Food	Magdeburg, Germany	<a href="http://www.insecta-conference.com">www.insecta-conference.com</a>
15-16.09.2016	21st Conference on Food Microbiology	Brussels, Belgium	Organized by the Belgian Society for Food Microbiology vzw/aslb (BSFM) <a href="http://www.bsfm.be">www.bsfm.be</a>
18-21.09.2016	130th AOAC Annual Meeting & Exposition	Dallas, Texas, USA	<a href="http://www.aoac.org/iMIS15_Prod/AOAC/Mtgs/16AM/AOAC_Member/MtgsCF/16AMCF/16AM_M.aspx?hkey=93d482bb-598c-4b59-84f0-a01e96f7f07d">http://www.aoac.org/iMIS15_Prod/AOAC/Mtgs/16AM/AOAC_Member/MtgsCF/16AMCF/16AM_M.aspx?hkey=93d482bb-598c-4b59-84f0-a01e96f7f07d</a>
22.09.2016	Food Safety Analysis Seminar	Brussels, Belgium	<a href="mailto:Analyze.nl@thermofisher.com">Analyze.nl@thermofisher.com</a>
26-28.09.2016	4th International Conference on Responsible Use of Antibiotics in Animals	The Hague, The Netherlands	<a href="http://www.bastiaanse-communication.com/RUA16/#xl_xr_page_index">http://www.bastiaanse-communication.com/RUA16/#xl_xr_page_index</a>
5-7.10.2016	dPCR EXPERIENCE WORKSHOP Practical workshop on different dPCR platforms	Ljubljana, Slovenia	<a href="http://biosistemika.com/products/nib-workshop/">http://biosistemika.com/products/nib-workshop/</a>
06-07.10.2016	European One Health Eco Health Workshop	Brussels, BELSPO, Belgium	<a href="http://www.biodiversity.be/health/58">http://www.biodiversity.be/health/58</a>



07.10.2016	Joint Meeting BWDS & DSWH : “ Wildlife Crossing Borders”	Antwerpen, ITG, Belgium	<a href="http://bwds.be/symposium/index.html">http://bwds.be/symposium/index.html</a>
10-12.10.2016	5th Beneficial Microbes Conference Beneficial impact of pre- and probiotics on human and animal health	Amsterdam, The Netherlands	<a href="http://www.bastiaanse-communication.com/BMC2016/">http://www.bastiaanse-communication.com/BMC2016/</a> <a href="http://beneficialmicrobes2016.org/index.php">http://beneficialmicrobes2016.org/index.php</a>
13.10.2016	Vitaminen in voeding, diervoeding en supplementen	Breda, The Netherlands	<a href="http://www.aoaclowlands.nl/inschrijvingen.html">http://www.aoaclowlands.nl/inschrijvingen.html</a>
16-21.10.2016	IDF World Dairy Summit	Rotterdam, The Netherlands	<a href="http://www.idfwds2016.com/">http://www.idfwds2016.com/</a>
18-19.10.2016	International Symposium LABS in a CRYSTAL BALL NEW TRENDS FOR MULTI-COMPONENTS ANALYSIS AOAC Europe Section, ACE Analytical Community Europe	Barcelona, Spain	<a href="http://www.aoaceurope.com/2016/Barcelona2016v3.pdf">http://www.aoaceurope.com/2016/Barcelona2016v3.pdf</a>
19-20.10.2016	Feed2016: 5th International Feed Conference: Present and future challenges	Geel, Belgium	<a href="http://www.feed2016.eu/">http://www.feed2016.eu/</a>
27-28.10.2016	5th International “Fresenius Feed Conference” Feed Additives – Animal Nutrition – Medicated Feed	Maritim Konferenzhotel Darmstadt/ Germany	<a href="https://www.akademie-fresenius.com/events/detail/produkt/5th-international-fresenius-feed-conference-feed-additives-animal-nutrition-medicated-feed/">https://www.akademie-fresenius.com/events/detail/produkt/5th-international-fresenius-feed-conference-feed-additives-animal-nutrition-medicated-feed/</a>
7-9.11.2016	The RME Conference Series – 11th conference Food Feed Water Analysis: Human Animal Diagnostics	Amsterdam, The Netherlands	<a href="http://www.rapidmethods.eu/">http://www.rapidmethods.eu/</a>
16-18.11.2016	“6th International Symposium on Food Packaging: Scientific Developments supporting Safety and Innovation (ILSI)	Barcelona, Spain	<a href="http://www.ilsio.org/Europe/Pages/Packaging-Materials-Symposium-2016-General-Information.aspx">http://www.ilsio.org/Europe/Pages/Packaging-Materials-Symposium-2016-General-Information.aspx</a>
28-29.11.2016	World Congress on Microbiology 2016	Valencia, Spain	<a href="http://microbiology.omicsgroup.com/europe/">http://microbiology.omicsgroup.com/europe/</a>
1-2.12.2016	One Health Symposium Focus on Genomics of Pathogenic Escherichia coli	Utrecht, The Netherlands	<a href="http://www.iss.it/vtec/?lang=2&amp;id=242&amp;tipo=20">http://www.iss.it/vtec/?lang=2&amp;id=242&amp;tipo=20</a>
25-26.01.2017	SEAFOOD SAFETY NEW FINDINGS & INNOVATION CHALLENGES	Brussels, Belgium	<a href="http://www.ecsafeseafoodconference.com">www.ecsafeseafoodconference.com</a>
09-13.07.2017	FEMS 7th Congress of European Microbiologists	Valencia, Spain	<a href="http://www.fems-microbiology2017.kenes.com/landing/Pages/default.aspx">http://www.fems-microbiology2017.kenes.com/landing/Pages/default.aspx</a>





# Labinfo