

EIND RAPPORT

PROFICIENCY TEST VOOR LEVENSMIDDELEN MICROBIOLOGIE

DETECTIE OP KARKASSWABS *YERSINIA ENTEROCOLITICA* – *E. COLI* O157:H7 – STEC

NOVEMBER 2013

Afdeling: Voedselpathogenen
Marie Polet
Nadine Botteldoorn
J. Wytsmanstraat 14
1050 Brussel | België
www.wiv-isp.be



Deze inter-laboratorium studie werd georganiseerd door het Nationaal Referentielaboratorium voor levensmiddelenmicrobiologie in samenwerking met het FAVV en was gericht aan de erkende laboratoria van het FAVV.

Ze is gericht op de detectie van *Yersinia enterocolitica*, *E. coli* O157:H7 en shiga-toxin producing *E. coli* (STEC) op karkasswabs.

1. Verloop van de studie

dinsdag 26 november 2013	<ul style="list-style-type: none">. Transport van de pakketten door een chauffeur van het WIV naar de dispatchingcentra (Melle en Gembloux). Opstarten van de analyses voor <i>Y. enterocolitica</i> door de laboratoria
woensdag 27 november 2013	Opstarten van de analyses voor <i>E. coli</i> O157:H7 door de laboratoria
vrijdag 13 december 2013	Doorsturen van resultaten
vrijdag 3 januari 2014	Tussentijds verslag doorgestuurd aan de laboratoria door het WIV
maandag 10 februari 2014	Eind rapport doorgestuurd aan de laboratoria door het WIV

Elk pakket bestemd naar de verschillende laboratoria bevatte:

- 6 stomacherzakken (1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3c) met elk 1 karkasswab
- 2 stomacherzakken aanvullend (4 en 5) voor laboratoria die de detectie (en isolatie) van STEC uitvoerden
- temperatuurscontrole registratieapparaat (voor de meeste laboratoria)
- een koelelement
- de instructies
- het nummer van het laboratorium



9 laboratoria waren ingeschreven voor de proficiency test en hebben de detectie van *E. coli* O157 : H7 uitgevoerd.

5 laboratoria hebben de detectie van *Y. enterocolitica* uitgevoerd.

5 laboratoria hebben de detectie van STEC uitgevoerd.

2 laboratoria hebben de detectie en de isolatie van STEC uitgevoerd.

ILVO – VOEDING	Melle
SGS	Antwerpen
QUALITY PARTNER	Herstal
FLVVM	Melle
SERVACO FOOD CONTROL	Wetteren
LFSAGx	Gembloux
ISP	Brussel
AGRO-ANALYSES	Metz, Frankrijk
CHEMIPHAR	Brugge

2. Materieel en methode van enting van de swabs

Materiaal

- Gebruikte stammen : *Yersinia enterocolitica* LMG 15558, *E. coli* O157:H7 niet pathogeen (sorbitol – , *stx* – , *eae* + , *hly* +), *E. coli* O111 (*eae* + , *stx1* – , *stx2* –) van voedingsoorsprong, *E. coli* O145 (*eae* + , *stx1* + , *stx2* –) van voedingsoorsprong
- BHI met *Y. enterocolitica*, optische densiteit (OD) = 0, 878, verdund tot de verdunning 10^{-4} in buffered peptone water
- BHI met *E. coli* O157H7, OD = 1,890, verdund tot de verdunning 10^{-7} in buffered peptone water



Finaal rapport - Proficiency Test karkasswabs 2013 |NRL Levensmiddelenmicrobiologie |

- BHI met *E. coli* O111, OD = 2,136, verdund tot de verdunning 10^{-6} in buffered peptone water
- BHI met *E. coli* O145, OD = 1,904, verdund tot de verdunning 10^{-6} in buffered peptone water
- Extract voor de contaminatie van de swab (representatief voor natuurlijke nevenflora): 25 g filet américain natuur + 225 ml gebufferd peptonwater → 1 minuut stomacheren → vloeistof = vleesextract. Dit extract werd nog één keer verdund (1/10) voor de swabs beënt met *Y. enterocolitica* om de nevenflora aanwezig in het staal te verminderen
- Katoenen swabs in stomacherzakken

Entingsmethode

Swab 1A en swab 1B

swab + 5 ml vleesextract + 100 µl van *Y. enterocolitica* (verdunning 10^{-4})

Swab 2A en sawb 2B

swab + 5 ml vleesextract + 100 µl van *E. coli* O157:H7 (verdunning 10^{-7})

Swab 3A en swab 3B

swab + 5 ml vleesextract

Swab 4

swab + 5 ml vleesextract + 100 µl van *E. coli* O111 (verdunning 10^{-6})

Swab 5

swab + 5 ml vleesextract + 100 µl van *E. coli* O145 (verdunning 10^{-6})



3. Entingsniveau

Om het inoculum niveau en de fout op het inoculum te bepalen werd het entingsniveau bepaald door de verdunningen in drievoud uit te platen op Nutrient agar

De swabs 1A en 1B waren beënt met 4606 ± 815 cfu ($3791 - 5421$) cfu van *Y. enterocolitica*

De swabs 2A en 2B waren beënt met 1 ± 1 cfu van *E. coli* O157:H7

De swab 4 was beënt met 40 ± 9 ($31 - 49$) cfu van *E. coli* O111

De swab 5 was beënt met 18 ± 7 ($11 - 25$) cfu van *E. coli* O145

4. Analyse procedure

De analyse start direct vanaf de stomacherzak waarin de karkasswab reeds aanwezig is . Er zijn 2 stomacherzakken (a en b) per staal (1, 2, 3). De zakken « a » worden gebruikt voor de detectie van *E. coli* O157 : H7 en de zakken « b » voor de detectie van *Y. enterocolitica*.

Voor laboratoria die deelnemen aan de detectie (en isolatie) van STEC, zijn er twee bijkomende stalen 4 en 5.

Het laboratorium moet de stalen voorbereiden zoals tijdens de routine analyses.

5. Geassocieerde analyses

Een homogeniteit test voor *Y. enterocolitica* werd op 26/11 uitgevoerd en een homogeniteit test voor *E. coli* O157 : H7 en STEC op 27/11. De stalen werden in drievoud geanalyseerd.

Y. enterocolitica werd gedetecteerd in de drie herhalingen van staal 1a.

E. coli O157 : H7 werd gedetecteerd in twee van de drie herhalingen van staal 2b.



Finaal rapport - Proficiency Test karkasswabs 2013 | NRL Levensmiddelenmicrobiologie |
E. coli O111 *eae* + , *stx1* – , *stx2* – werd gedetecteerd in de drie herhalingen van staal 4.

E. coli O145 *eae* + , *stx1* + , *stx2* – werd gedetecteerd in de drie herhalingen van staal 5.

6. Resultaten van de laboratoria

Te verwachten resultaat:

Staal 1a/1b : afwezigheid van *E. coli* O157:H7
 aanwezigheid van *Yersinia enterocolitica*

Staal 2a/2b: aanwezigheid van *E. coli* O157:H7
 afwezigheid van *Yersinia enterocolitica*

Staal 3a/3b: afwezigheid van *E. coli* O157:H7
 afwezigheid van *Yersinia enterocolitica*

Staal 4: afwezigheid van STEC (*E. coli* O111 *eae* + , *stx1* – , *stx2* –)

Staal 5: aanwezigheid van STEC (*E. coli* O145 *eae* + , *stx1* + , *stx2* –)

staal	<i>E. coli</i> O157:H7			<i>Yersinia enterocolitica</i>		
	1	2	3	1	2	3
n° labo						
2	afwezig	afwezig	afwezig	/	/	/
4	afwezig	aanwezig	afwezig	aanwezig	afwezig	afwezig
5	afwezig	aanwezig	afwezig	aanwezig	afwezig	afwezig
10	afwezig	aanwezig	afwezig	/	/	/
11	afwezig	aanwezig	afwezig	aanwezig	afwezig	afwezig
17	afwezig	aanwezig	afwezig	/	/	/
21	afwezig	aanwezig	afwezig	aanwezig	afwezig	afwezig
24	afwezig	aanwezig	afwezig	/	/	/
28	afwezig	aanwezig	afwezig	aanwezig	afwezig	afwezig

/ : niet deelgenomen voor deze analyse

... : resultaat niet conform



staal	STEC screening							
	4				5			
	eae	stx1	stx2	serogroep	eae	stx1	stx2	serogroep
n° labo								
2	+	-	-	O111	+	+	-	O145
4	+	-	-	/	+	+	-	O145
5	+	-	-	/	+	+	+	/
17	+	-	-	O111	+	+	-	O145
21	+	-	-	/	+	+	-	O145

stalen	STEC isolatie							
	4				5			
	eae	stx1	stx2	serogroep	eae	stx1	stx2	serogroep
n° labo								
2	+	-	-	O111	+	+	-	O145
4	/	/	/	/	/	/	/	/
5	/	/	/	/	/	/	/	/
17	/	/	/	/	/	/	/	/
21	+	-	-	O111	+	+	-	O145

/ : niet deelgenomen voor deze analyse

.... : resultaat niet conform

7. Conclusies

Gezien het hoge aantal *Enterobacteriaceae* die aanwezig zijn in deze matrix en die ook interfereren op de isolatie media voor de detectie van *Y. enterocolitica*, was het NRL genoodzaakt om de stalen met een hogere hoeveelheid te besmetten. Ondanks dit bleef het aflezen van de isolatieplaat moeilijk omdat er maar een beperkte groei plaatsvond van *Y. enterocolitica*.

Alle laboratoria hebben *Yersinia enterocolitica* op een correcte manier gedetecteerd in staal 1.

Wat betreft de detectie van *E. coli* O157 : H7, heeft het laboratorium n° 2 de kiem niet kunnen detecteren ondanks de extra analyse testen die op dit staal zijn gebeurd (PCR).



Gezien dit staal gecontamineerd werd op de detectielimiet van de methode, wat ook werd waargenomen tijdens de homogeniteitstesten, waarbij slechts twee van de drie herhalingen positief waren voor *E. coli* O157:H7, werd er besloten om een parallelle test uit te voeren tussen het betrokken laboratorium en het NRL om zo ook hun performantie te evalueren.

Voor de detectie en isolatie van STEC, hebben alle deelnemende laboratoria de betreffende kiemen gedetecteerd en ook geïsoleerd. Laboratorium n° 5 had wel een vals positief signaal voor de detectie van het *stx2* gen want de gebruikte *E. coli* O145 stam droeg dit virulentiegen niet.

Voor de uitdrukking van de resultaten hebben de laboratoria 2, 4 en 5 hun resultaten niet conform de ISO/TS 13136 gerapporteerd.

Volgende tabel geeft aan hoe het resultaat dient uitgedrukt te worden conform de norm.



screening		isolatie van de kolonies	
Resultaat	Uitdrukking van resultaat	Resultaat	Uitdrukking van resultaat
<i>stx - , eae +/-</i>	geen detectie van STEC (serogroep) in x g of ml of swab	/	/
<i>stx + , eae -</i>	vermoedelijke detectie van STEC (serogroep) in x g of ml of swab	<i>stx - , eae -</i> of geen typische kolonie	geen isolatie
		<i>stx + , eae -</i>	aanwezigheid van STEC (serogroep) in x g of ml of swab
<i>stx + , eae +</i>	vermoedelijke detectie van STEC (serogroep) possédant le gène <i>eae</i> in x g of ml of swab	<i>stx + , eae +</i>	aanwezigheid van STEC (serogroep) die het gen <i>eae</i> dragt in x g of ml of swab
		<i>stx - , eae -</i> of geen typische kolonie	geen isolatie
		<i>stx - , eae +</i>	geen isolatie
		<i>stx + , eae -</i>	aanwezigheid van STEC (serogroep) in x g of ml of swab
		<i>stx + , eae +</i>	aanwezigheid van STEC (serogroep) die het gen <i>eae</i> dragt in x g of ml of swab



Een tussentijds verslag werd begin januari elektronisch aan de laboratoria doorgestuurd. Het finale verslag werd op 10 februari 2014 elektronisch doorgestuurd en is verkrijgbaar via de post op aanvraag.

De volgende proficiency test « detectie van *Yersinia enterocolitica* – *E. coli* O157:H7 – STEC op karkasswabs» zal in maart-april 2014 georganiseerd worden.