

EINDRAPPORT

PROFICIENCY TEST VOOR LEVENSMIDDELENMICROBIOLOGIE

PT 1 – 2015 DETECTIE VAN PATHOGENE *E. COLI* IN KIEMGROENTEN

MAART 2015

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



Deze interlaboratorium studie werd georganiseerd door het Nationaal Referentielaboratorium voor levensmiddelenmicrobiologie in samenwerking met het FAVV en was bedoeld voor de erkende laboratoria van het FAVV.

Ze heeft betrekking op de detectie van *E. coli* O157:H7 en shigatoxine producerende *E. coli* (STEC) in soja kiemgroenten.

1. Verloop van de studie

dinsdag 17 maart 2015	Transport van de pakketten door een chauffeur van het WIV naar de dispatchingcentra (Melle en Gembloux)
woensdag 18 maart 2015	Opstarten van de analyses door de laboratoria
dinsdag 31 maart 2015	Doorsturen van resultaten
vrijdag 24 april 2015	Tussentijds verslag doorgestuurd aan de laboratoria door het WIV
vrijdag 5 juni 2015	Eindrapport doorgestuurd aan de laboratoria door het WIV

Elk pakket bestemd voor de verschillende laboratoria bevatte:

- 3 stomacherzakken (1, 2, 3,) met elk 25g kiemgroenten voor de detectie van *E.coli* O157:H7
- 3 aanvullende stomacherzakken (4, 5 en 6) voor laboratoria die de detectie (en isolatie) van STEC uitvoerden
- temperatuurscontrole registratieapparaat (voor de meeste laboratoria)
- een koelelement
- de instructies

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

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



ILVO – VOEDING	Melle
WIV	Brussel
QUALITY PARTNER	Herstal
EUROFINS	Brugge
SERVACO FOOD CONTROL	Wetteren
LFSAGx	Gembloux
SGS	Antwerpen
FLVVM	Melle
HVS	Mons

2. Materiaal en methode van enting van de swabs

Materiaal

- Gebruikte stammen : een niet pathogene *E. coli* O157:H7 (*stx* – *eae* + *hly* +) EH 630 AZ VUB, *E. coli* O157:H7 (*stx*1 + *stx*2 + *eae* +) TIAC 777 WIV-ISP, *E. coli* O26 (*stx*1 + *stx*2 + *eae* +) TIAC 778 WIV-ISP
- BHI met een niet pathogene *E. coli* O157:H7, OD = 1 verdund tot de verdunning 10^{-4} in gebufferd peptonwater
- BHI met een pathogene *E. coli* O157:H7, OD = 1 verdund tot de verdunning 10^{-5} in gebufferd peptonwater
- BHI met *E. coli* O26, OD = 1 verdund tot de verdunning 10^{-4} in gebufferd peptonwater
- 25 g soja kiemgroenten



Entingsmethode

Staal 1

25g soja kiemgroenten + 100 µl van de niet pathogene *E. coli* O157:H7 (verdunning 10^{-4}) en 100 µl *E. coli* O26 pathogeen (verdunning 10^{-4})

Staal 2

25g soja kiemgroenten + 100 µl van de pathogene *E. coli* O157:H7 (verdunning 10^{-5})

Staal 3

25g soja kiemgroenten

Staal 4

25g soja kiemgroenten + 100 µl van de pathogene *E. coli* O157:H7 (verdunning 10^{-4})

Staal 5

25g soja kiemgroenten

Staal 6

25g soja kiemgroenten + 100 µl van de niet pathogene *E. coli* O157:H7 (verdunning 10^{-4}) en 100 µl pathogene *E. coli* O26 (verdunning 10^{-4})

3. Entingsniveau

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

De stalen 1 en 6 waren beënt met $188 \text{ kve} \pm 20 \text{ kve/g}$ (168 – 208) niet pathogene *E. coli* O157 : H7 en met $84 \text{ kve} \pm 16 \text{ kve/g}$ (68 – 100) pathogene *E. coli* O26.

De staal 2 was beënt met $27 \text{ kve} \pm 6 \text{ kve/g}$ (21 – 33) pathogene *E. coli* O157 : H7.



De stalen 3 en 5 waren niet beënt.

De staal 4 was beënt met $273 \text{ kve} \pm 64 \text{ kve/g}$ (209 – 337) pathogene *E. coli* O157 : H7.

4. Analyseprocedure

De analyse startte rechtstreeks vanaf de stomacherzak waarin de 25g matrix zich bevond . De laboratoria die alleen deelnamen aan de detectie van *E. coli* O157 : H7 ontvangen stomacherzakken 1, 2, 3. De laboratoria die ook deelnemen aan de detectie (en isolatie) van STEC ontvangen drie bijkomende stomacherzakken 4, 5 en 6. Het laboratorium moet de stalen voorbereiden zoals tijdens de routine analyses.

5. Geassocieerde analyses

Een stabiliteitstest werd op 18/03 uitgevoerd. De stalen werden in drievoud geanalyseerd.

De stalen waren stabiel.

6. Resultaten van de laboratoria

Te verwachten resultaat:

Stalen 1 en 6 : *E. coli* O157:H7/25g gedetecteerd

aanwezigheid van STEC (*E. coli* O26 *eae* + *stx1* + *stx2*+)/25g

Stalen 2 en 4: *E. coli* O157:H7/25g gedetecteerd

aanwezigheid van STEC (*E. coli* O157 *eae* + *stx1* + *stx2*+)/25g

Stalen 3 en 5: *E. coli* O157:H7/25g niet-gedetecteerd

afwezigheid van STEC/25g



Resultaten van de laboratoria :

Stalen 1 tot 3:

staal	<i>E. coli</i> O157H7		
	1	2	3
n° labo			
2	gedetecteerd/25g	gedetecteerd/25g	niet-gedetecteerd/25g
4	gedetecteerd/25g	gedetecteerd/25g	niet-gedetecteerd/25g
5	gedetecteerd/25g	gedetecteerd/25g	niet-gedetecteerd/25g
10	niet-gedetecteerd/25g	gedetecteerd/25g	niet-gedetecteerd/25g
11	gedetecteerd/25g	gedetecteerd/25g	niet-gedetecteerd/25g
17	niet-gedetecteerd/25g	gedetecteerd/25g	niet-gedetecteerd/25g
21	gedetecteerd/25g	gedetecteerd/25g	niet-gedetecteerd/25g
23	gedetecteerd/25g	gedetecteerd/25g	niet-gedetecteerd/25g
28	gedetecteerd/25g	gedetecteerd/25g	niet-gedetecteerd/25g

 : resultaat niet conform

Stalen 4 tot 6:

staal	STEC screening											
	4				5				6			
	<i>eae</i>	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	serogroep	<i>eae</i>	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	serogroep	<i>eae</i>	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	serogroep
n° labo												
2	+	+	+	/	-	-	-	/	+	+	+	/
4	+	+	+	O157	-	-	-	OND	+	+	+	O26 en
17	+	+	+	O157	-	-	-	/	+	+	+	O26 en O157
21	+	+	+	O157	-	-	-	/	+	+	+	O26 en O157



staal	STEC isolatie									
	4					5				
n° labo	eeae	stx1	stx2	serogroep	conclusie	eeae	stx1	stx2	serogroep	conclusie
2	+	+	+	O157	Aanwezigheid van STEC, drager van het eae gen	-	-	-	OND	Afwezigheid van STEC
4	+	+	+	O157	Aanwezigheid van STEC, drager van het eae gen	-	-	-	OND	Afwezigheid van STEC
17	+	+	+	O157	Aanwezigheid van STEC, drager van het eae gen	/	/	/	/	Afwezigheid van STEC
21	+	+	+	O157 : H7	Aanwezigheid van STEC, drager van het eae gen	/	/	/	/	Afwezigheid van STEC

staal	STEC isolatie				
	6				
n° labo	eeae	stx1	stx2	serogroep	conclusie
2	+	+	+	O26	Aanwezigheid van STEC, drager van het eae gen
4	+	+	+	O26	Aanwezigheid van STEC, drager van het eae gen
17	+	+	+	O26	Aanwezigheid van STEC, drager van het eae gen
21	+	+	+	O26	Aanwezigheid van STEC, drager van het eae gen

/ : niet deelgenomen voor deze analyse

.... : resultaat niet conform



7. Discussie

Deel “detectie *E. coli* O157 :H7”

De laboratoria 10 en 17 hadden een vals-negatief resultaat voor staal 1. Het laboratorium 10 heeft een commerciële kit gebruikt en alhoewel de instructies van de leverancier goed gevolgd werden, kon *E.coli* O157 niet worden gedetecteerd. De alternatieve methoden die op de markt zijn, zijn weliswaar ISO 16140 gevalideerd maar hun prestaties kunnen nog steeds afhankelijk zijn van de geanalyseerde matrix.

Het laboratorium 17 heeft de ISO/TS 13136 methode gebruikt bestemd voor STEC detectie om *E. coli* O157 :H7 en *E. coli* STEC te detecteren. Betreffende *E. coli* O157:H7 detectie, op isolatie niveau heeft het laboratorium de ISO norm 16654 (detectie *E. coli* O157 :H7 en *E. coli* STEC) niet gevolgd en ook geen ISO 16140-2 gevalideerde alternatieve methode, zoals voorgeschreven door de ISO/TS 13136 norm.

Alle laboratoria hebben *E. coli* O157 : H7 gedetecteerd in staal 2.

De 2 laboratoria met een vals negatief resultaat voor staal 1 hebben een correct resultaat voor staal 2 dat enkel beënt werd met *E. coli* O157 :H7.

Er zijn geen vals positieve resultaten voor staal 3.

Deel “detectie en isolatie STEC”

Voor wat betreft de detectie en isolatie van STEC, hebben alle deelnemende laboratoria STEC gedetecteerd en geïsoleerd.

Het laboratorium 4 had een vals negatief signaal voor de detectie van de serogroep O157 in staal 6. Zonder deze informatie kon het laboratorium de ISO norm 16654



Finaal rapport - Proficiency Test pathogene *E.coli* 2015 | NRL Levensmiddelenmicrobiologie |
(detectie *E. coli* O157 :H7) of een ISO 16140-2 gevalideerde alternatieve methode voor de isolatie, zoals gevraagd door de ISO/TS 13136 norm niet volgen.

Op screeningsniveau heeft het laboratorium 17 de O157 serogroep goed gedetecteerd maar, op isolatie niveau heeft het laboratorium de ISO norm 16654 (detectie *E. coli* O157 :H7 en *E. coli* STEC) niet gevolgd en ook geen ISO 16140-2 gevalideerde alternatieve methode, zoals voorgeschreven door de ISO/TS 13136 norm.

8. Conclusies

De keuze van de matrix "kiemgroenten " kadert in het nieuwe microbiologische criteria van de Europese Verordening n°209/2013 die een amendement is van de Europese Verordening 2073/2005, die de afwezigheid van VTEC O157, O26, O111, O103, O145 et O104:H4 in 25g in kiemgroenten vraagt volgens de norm ISO/TS 13136.

Volgens deze nieuwe Europese regelgeving, dienen de officiële controlelaboratoria klaar te zijn voor de detectie van VTEC in gekiemde zaden.

Kiemgroenten zijn een zeer complexe matrix omdat er veelnevenflora aanwezig is in deze matrix. De gebruikte analysemethode is daarom erg belangrijk. Naargelang het aanrijkingsmedium, het uitvoeren van een immuno-magnetische scheiding of niet, het gebruikte isolatiemedium, kan de groei van de gezochte pathogeen en isolatie ervan (in het bijzonder *E. coli* O157: H7 en STEC) beïnvloed worden door de nevenflora.

De ISO / TS13136, ISO 16654 en de ISO 16140 gevalideerde commerciële kits raden bovendien het gebruik van aanrijkingsmedia (BPW en / of mTSB) aangevuld met novobiocine, acriflavine aan voor matrices met veel nevenflora.

Zoals hoger reeds aangegeven dient men voorzichtig te zijn met alternatieve methoden gevalideerd volgens ISO 16140 die op de markt zijn, want hun prestaties kunnen nog steeds afhankelijk zijn van de geanalyseerde matrix.

Het is daarom van groot belang dat de laboratoria de analyse van deze matrices evalueren en een verificatie uitvoeren indien dit nodig wordt geacht.



Finaal rapport - Proficiency Test pathogene *E.coli* 2015 | NRL Levensmiddelenmicrobiologie |

De resultaten van de ringonderzoeken worden door het WIV automatisch overgebracht via de PT-schema software naar de database van het FAVV, de deelnemende laboratoria dienen dus verder niets te doen.

Een tussentijds verslag werd op 24 april 2015 elektronisch aan de laboratoria doorgestuurd. Het finale verslag werd op 5 juni 2015 elektronisch doorgestuurd en is verkrijgbaar via de post op aanvraag.

De volgende proficiency test « detectie » zal in maart-april 2016 georganiseerd worden.