

EINDRAPPORT

PROFICIENCY TEST VOOR LEVENSMIDDELENMICROBIOLOGIE

PT 1 – 2016 DETECTIE VAN PATHOGENE *E. COLI*, *E. COLI* O157 : H7 EN *YERSINIA ENTEROCOLITICA* IN GEHAKT

MAART 2016

Dit rapport wordt door het WIV uitsluitend verdeeld aan de deelnemers van dit ringonderzoek. Het WIV is niet verantwoordelijk voor het gebruik van dit document door de houders ervan. De ontvangers van dit rapport zijn zelf verantwoordelijk voor het gebruik ervan.

Afdeling: Voedselpathogenen
Wetenschappelijke verantwoordelijke: M. Polet
Technische verantwoordelijke: W. Boukhouchi
Wetenschappelijke goedkeuring: N. Botteldoorn
J. Wytsmanstraat 14
1050 Brussel | België
www.wiv-isp.be

Deze interlaboratorium studie had betrekking op de detectie van *E. coli* O157 : H7, en shigatoxine producerende *E. coli* (STEC) en *Y. enterocolitica* in gehakt, een voedingsmatrix die natuurlijk gecontamineerd is met een mesofiele flora. De matrix, gehaktmengsel van varken en rund werd gekozen.

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

1. Verloop van de studie

dinsdag 15 maart 2016	<ul style="list-style-type: none"> • bereiding en enting van de stalen • transport van de pakketten door een chauffeur van het WIV naar de dispatchingcentra (Melle en Gembloux)
woensdag 16 maart 2016	opstarten van de analyses door de laboratoria
woensdag 30 maart 2016	Limiet datum voor het doorsturen van resultaten
maandag 18 april 2016	tussentijds verslag doorgestuurd aan de laboratoria door het WIV
donderdag 30 juni 2016	eindrapport doorgestuurd aan de laboratoria door het WIV

Elk pakket bestemd voor de verschillende laboratoria bevatte:

- 3 stomacherzakken (1, 2, 3) met elk 10g gehakt voor de detectie van *Y. enterocolitica*
- 3 stomacherzakken (4, 5, 6) met elk 25g gehakt voor de detectie van *E.coli* O157:H7
- 3 aanvullende stomacherzakken (7, 8 en 9) met elk 25g gehakt voor laboratoria die de detectie (en isolatie) van STEC uitvoerden
- temperatuurscontrole registratieapparaat (voor de meeste laboratoria)



- een koelement
- de instructies

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.

6 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

1 extern laboratorium, heeft alle analyses uitgevoerd als getuige voor het organiserend laboratoria.

2. Materiaal en methode van enting

Materiaal

- Gebruikte stammen : pathogene *Y. enterocolitica* , een niet pathogene *E. coli* O157:H7 (*stx* – *eae* + *hly* +) (oorsprong EH 630 AZ VUB) en 2 pathogene stammen : *E. coli* O157 :H7 (*stx1* + *stx2* + *eae* +) TIAC 3269 (oorsprong EURL STEC) = stam 1, *E. coli* O157:H7 (*stx1* + *stx2* + *eae* +) TIAC 777 (oorsprong WIV-ISP) = stam 2



Finaal rapport - PT 1 - 2016 Detectie vlees | NRL Levensmiddelenmicrobiologie |

- BHI met een niet pathogene *E. coli* O157:H7, OD = 1 verdund tot de verdunning 10^{-4} en 10^{-6} in gebufferd peptonwater
- BHI met een pathogene *E. coli* O157:H7 stam 1, OD = 1 verdund tot de verdunning 10^{-4} in gebufferd peptonwater
- BHI met een pathogene *E. coli* O157:H7 stam 2, OD = 1 verdund tot de verdunning 10^{-4} in gebufferd peptonwater
- BHI met *Y. enterocolitica* verdund tot de verdunning 10^{-4} in gebufferd peptonwater
- 10g (*Y. enterocolitica*) of 25 g (*E. coli*) van het gemengd gehakt welke werd bevroren-ontdooit de dag van enting.

Entingsmethode

Staal 1

10g gehakt + 100 μ l van *Y. enterocolitica* (verdunning 10^{-4})

Staal 2

10g gehakt + 100 μ l van *Y. enterocolitica* (verdunning 10^{-4})

Staal 3

10g gehakt

Staal 4

25g gehakt

Staal 5

25g gehakt + 100 μ l van de niet pathogene *E. coli* O157:H7 (verdunning 10^{-6})

Staal 6

25g gehakt + 100 μ l van de niet pathogene *E. coli* O157:H7 (verdunning 10^{-6})



Staal 7

25 g gehakt + 100 µl van de niet pathogene *E. coli* O157 : H7 (verdunning 10^{-4}) +
100 µl van de pathogene *E. coli* O157:H7 stam 1 (verdunning 10^{-4})

Staal 8

25g gehakt

Staal 9

25 g gehakt + 100 µl van pathogene *E. coli* O157:H7 stam 2 (verdunning 10^{-4})

3. Entingsniveau

Om het inoculum niveau en de fout op het inoculum te bepalen werd de verdunningen in drievoud uitgeplaat op een niet selectief milieu : nutrient agar.

De stalen 1 en 2 waren beënt met 7179 - 10089 kve/10g *Y. enterocolitica*.

De stalen 3, 4 en 8 waren niet beënt.

De stalen 5 en 6 waren beënt met 27- 41 kve/25g niet pathogene *E. coli* O157:H7.

Het staal 7 was beënt met 3587 – 4987 kve/25g pathogene *E. coli* O157:H7 stam 1 en met 2933 – 3807 kve/25g niet pathogene *E. coli* O157:H7 .

Het staal 9 was beënt met 4600 – 5640 kve/25g pathogene *E. coli* O157:H7 stam 2.

4. Analyseprocedure

De analyse startte rechtstreeks vanaf de stomacherzak waarin de matrix zich bevond .

De laboratoria die alleen deelnamen aan de detectie van *E. coli* O157:H7 en *Y. enterocolitica* ontvangen stomacherzakken 1 tot 6. De laboratoria die ook deelnemen aan de detectie (en isolatie) van STEC ontvangen drie bijkomende stomacherzakken 7, 8 en 9.

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



5. Geassocieerde analyses

Een homogeniteitstest werd op 16/03 uitgevoerd, dag wanneer de laboratoria de analyses dienen te starten. Er werden 3 stalen geanalyseerd voor elke type staal (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9).

De stalen waren stabiel.

6. Resultaten van de laboratoria

Te verwachten resultaat:

Stalen 1 en 2: *Y. enterocolitica* gedetecteerd

Staal 3: *Y. enterocolitica* niet gedetecteerd

Staal 4: *E. coli* O157:H7 niet-gedetecteerd

Stalen 5 en 6: *E. coli* O157:H7 gedetecteerd

Stalen 7 en 9: (verdachte) aanwezigheid van STEC drager van het *eae* gen (*E. coli* O157 *eae* +, *stx1* +, *stx2* +)

Staal 8: afwezigheid van STEC

Resultaten van de laboratoria :

staal	<i>Yersinia enterocolitica</i>			<i>E. coli</i> O157: H7		
	1	2	3	4	5	6
n° labo						
2	/	/	/	Niet gedetecteerd/25g	Gedetecteerd/25g	Gedetecteerd/25g
4	Gedetecteerd/10g	Gedetecteerd/10g	Niet gedetecteerd/10g	Niet gedetecteerd/25g	Niet gedetecteerd/25g	Gedetecteerd/25g
5	Niet gedetecteerd/10g	Niet gedetecteerd/10g	Niet gedetecteerd/10g	Niet gedetecteerd/25g	Gedetecteerd/25g	Gedetecteerd/25g
10	/	/	/	Niet gedetecteerd/25g	Gedetecteerd/25g	Gedetecteerd/25g
11	Gedetecteerd/10g	Gedetecteerd/10g	Gedetecteerd/10g	Niet gedetecteerd/25g	Gedetecteerd/25g	Gedetecteerd/25g
17	/	/	/	Niet gedetecteerd/25g	Gedetecteerd/25g	Gedetecteerd/25g
21	Gedetecteerd/10g	Gedetecteerd/10g	Niet gedetecteerd/10g	Niet gedetecteerd/25g	Gedetecteerd/25g	Gedetecteerd/25g
23	/	/	/	Niet gedetecteerd/25g	Gedetecteerd/25g	Gedetecteerd/25g
28	Gedetecteerd/10g	Gedetecteerd/10g	Niet gedetecteerd/10g	Niet gedetecteerd/25g	Gedetecteerd/25g	Gedetecteerd/25g

.... : resultaat niet conform / : niet deelgenomen voor deze analyse



stalen	STEC screening											
	7				8				9			
	eeae	stx1	stx2	serogroep	eeae	stx1	stx2	serogroep	eeae	stx1	stx2	serogroep
n° labo												
2	+	+	+	O157	-	-	-	OND	+	+	+	O157
4	+	+	+	/	-	-	-	/	+	+	+	/
5	+	+	+	O157	+	+	+	O157	+	+	+	O157
10	+	+	+	O157	-	-	-	OND	+	+	+	O157 et O26
17	+	+	+	O157	-	-	-	/	+	+	+	O157
21	+	+	+	O157	-	-	-	/	+	+	+	O157

stalen	STEC isolatie											
	7				8				9			
	eeae	stx1	stx2	serogroep	eeae	stx1	stx2	serogroep	eeae	stx1	stx2	serogroep
n° labo												
2	+	+	+	O157	/	/	/	/	+	+	+	O157
4	+	+	+	O157	/	/	/	/	+	+	+	O157
5	/	/	/	O157	/	/	/	O157	/	/	/	O157
10	+	+	+	O157	/	/	/	/	+	+	+	O157
17	+	+	+	O157	/	/	/	/	+	+	+	O157
21	+	+	+	O157	/	/	/	/	+	+	+	O157

stalen	STEC conclusie											
	7				8				9			
n° labo												
2	Aanwezigheid van STEC drager van het eae gen				Afwezigheid van STEC				Aanwezigheid van STEC drager van het eae gen			
4	Aanwezigheid van STEC drager van het eae gen				Afwezigheid van STEC				Aanwezigheid van STEC drager van het eae gen			
5	Aanwezigheid van STEC				Aanwezigheid van STEC				Aanwezigheid van STEC			
10	Aanwezigheid van STEC drager van het eae gen				Afwezigheid van STEC				Verdachte aanwezigheid van STEC drager van het eae gen			
17	Aanwezigheid van STEC drager van het eae gen				Afwezigheid van STEC				Aanwezigheid van STEC drager van het eae gen			
21	Aanwezigheid van STEC drager van het eae gen				Afwezigheid van STEC				Aanwezigheid van STEC drager van het eae gen			

- + : gedetecteerd
- : niet gedetecteerd
- OND: serogroep niet bepaald
- / : niet deelgenomen voor deze analyse
- ... : resultaat niet conform



7. Discussie

“detectie *E. coli* O157 :H7 en *Y. enterocolitica*”

Het laboratorium 4 had een vals-negatief resultaat voor staal 5 - *E. coli* O157 :H7. Het resultaat voor staal 6 – *E. coli* O157 :H7 is correct. Dit laboratorium heeft een alternatieve methode ISO 16140 gevalideerd gebruikt. De vals-negatief resultaat betreft de screeningsstap van de methode (commerciële kit-zelf) en niet de stap van isolatie.

Het laboratorium 5 had twee vals-negatieve resultaten voor stalen 1 en 2 - *Y. enterocolitica*. Het laboratorium heeft een interne methode gebruikt.

Het laboratorium 11 had een vals-positief resultaat voor staal 3 - *Y. enterocolitica*. Dit laboratorium gebruikt de ISO norm.

Er is geen vals-positief resultaat voor staal 4 – *E. coli* O157 :H7.

Er is geen vals-positief resultaat voor staal 6 – *E. coli* O157 :H7.

“detectie STEC”

Eén laboratorium heeft niet deelgenomen aan de isolatie stap .

Het laboratorium 5 had vals positieve resultaten voor virulentiegenen *stx 1*, *stx 2*, *eae* en voor de serogroep O157 op de screeningsniveau van de detectie in staal 8. Het labo heeft ook een vals-positief resultaat voor de serogroep O157 op isolatiesniveau van de detectie in staal 8. Eveneens, voor de stalen 7 en 9, de gebruikte bevestiging volgt niet de eisen van ISO/TS 13136:2012.

Het laboratorium 10 heeft een vals-positief resultaat voor serogroep O26 op screeningsniveau van de detectie.

Voor wat betreft de uitdrukking van resultaten (= conclusie), conform ISO/TS 13136:2012 :



- Voor het laboratorium 5, het resultaat is niet overeenkomstig met de resultaten van de screeningsstap voor de stalen 7, 8 en 9.
- Voor het laboratorium 10, het resultaat is niet overeenkomstig met de resultaten van de isolatiesstap.

8. Conclusies

De gegevens rond de gebruikte methode zijn van groot belang voor het NRL. Inderdaad, soms geven ze een verklaring voor de niet conforme resultaten, en terzelfdertijd valideren ze de gebruikte methode.

De matrixgehakt bevat veel nevenflora. 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 selectieve aanrijkingsmedia voor matrices met veel nevenflora aan.

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 18 april 2016 elektronisch aan de laboratoria doorgestuurd. Het finale verslag werd op 30 juni 2016 elektronisch doorgestuurd en is verkrijgbaar via de post op aanvraag.

De volgende proficiency test « detectie » zal in maart-april 2017 georganiseerd worden.