

# RAPPORT FINAL

ESSAI D'APTITUDE EN MICROBIOLOGIE ALIMENTAIRE

PT 1 – 2015 DETECTION DE *E. COLI* PATHOGENE DANS  
LES GRAINES GERMEES

MARS 2015

Section: Pathogènes alimentaires  
Polet Marie  
Botteldoorn Nadine – Sarah Denayer  
Rue J. Wytsman 14  
1050 Bruxelles | Belgique

[www.wiv-isp.be](http://www.wiv-isp.be)



Cet essai d'aptitude a été organisée par le Laboratoire National de Référence (LNR) en microbiologie alimentaire en collaboration avec l'AFSCA et était destiné aux laboratoires agréés par l'AFSCA.

Il porte sur la détection de *E. coli* O157:H7 et des *E. coli* productrices de shiga-toxines (STEC) dans les graines germées de soja.

## 1. Déroulement de l'étude

mardi 17 mars 2015	transport des colis par un chauffeur de l'ISP vers les 2 dispatchings (Melle et Gembloux)
mercredi 18 mars 2015	laboratoires débutent les analyses pour <i>E. coli</i> O157:H7 (et STEC)
mardi 31 mars 2015	date limite pour la soumission des résultats
vendredi 24 avril 2015	rapport intermédiaire envoyé aux laboratoires par l'ISP
Vendredi 5 juin 2015	rapport final envoyé aux laboratoires par l'ISP

Chaque colis contenait :

- 3 sacs stomacher (1, 2, 3) contenant chacun 25g de graines germées pour la détection de *E. coli* O157:H7
- 3 sacs stomachers supplémentaires (4, 5 et 6) pour les laboratoires effectuant la détection (et isolement) de STEC
- un traceur de température (pour la plupart des laboratoires)
- un bloc réfrigérant
- les instructions

9 laboratoires se sont inscrits à l'essai et ont effectué la détection de *E. coli* O157:H7.

4 laboratoires ont effectué la détection et l'isolement de STEC.



ILVO – VOEDING	Melle
ISP	Bruxelles
QUALITY PARTNER	Herstal
EUROFINS	Bruges
SERVACO FOOD CONTROL	Wetteren
LFSAGx	Gembloux
SGS	Antwerpen
FLVVM	Melle
HVS	Mons

## 2. Matériel et méthode de contamination des swabs

### Matériel

- Souches utilisées : *E. coli* O157 : H7 non pathogène (*stx* – , *eae* + , *ehx* +) EH 630 AZ VUB, *E. coli* O157 : H7 (*stx1* + *stx2* + *eae* +) TIAC 777 WIV-ISP, *E. coli* O26 ( *stx1*+ *stx2* + *eae* +) TIAC 778 WIV-ISP
- BHI de *E. coli* O157:H7 non pathogène, DO = 1 dilué jusqu'à la dilution 10<sup>-4</sup> dans de l'eau peptonée tamponnée
- BHI de *E. coli* O157 :H7 pathogène, DO = 1 dilué jusqu'à la dilution 10<sup>-5</sup> et 10<sup>-6</sup> dans de l'eau peptonée tamponnée
- BHI de *E. coli* O26 pathogène, DO = 1 dilué jusqu'à la dilution 10<sup>-4</sup> dans de l'eau peptonée tamponnée
- 25 g de graines germées de soja



## **Méthode de contamination**

### Echantillon 1

25 g graines germées de soja + 100 µl de *E. coli* O157 : H7 non pathogène (dilution  $10^{-4}$ ) et 100 µl de *E. coli* O26 pathogène (dilution  $10^{-4}$ )

### Echantillon 2

25 g graines germées de soja + 100 µl de *E. coli* O157 : H7 pathogène (dilution  $10^{-5}$ )

### Echantillon 3

25 g graines germées de soja

### Echantillon 4

25 g graines germées de soja + 100 µl de *E. coli* O157 : H7 pathogène (dilution  $10^{-4}$ )

### Echantillon 5

25 g graines germées de soja

### Echantillon 6

25 g graines germées de soja + 100 µl de *E. coli* O157 : H7 non pathogène (dilution  $10^{-4}$ ) et 100 µl de *E. coli* O26 pathogène (dilution  $10^{-4}$ )

## **3. Taux de contamination**

Pour déterminer le niveau de l'inoculum et calculer la faute sur l'inoculum, le niveau de contamination a été déterminé en dénombrant les dilutions en triple sur une gélose nutritive.



Les échantillons 1 et 6 ont été contaminés avec  $188 \text{ ufc} \pm 20 \text{ ufc/g}$  (168 – 208) de *E. coli* O157 : H7 non pathogène et avec  $84 \text{ ufc} \pm 16 \text{ ufc/g}$  (68 – 100) de *E. coli* O26 pathogène.

L'échantillon 2 a été contaminé avec  $27 \text{ ufc} \pm 6 \text{ ufc/g}$  (21 – 33) de *E. coli* O157 : H7 pathogène.

Les échantillons 3 et 5 n'ont pas été contaminés.

L'échantillon 4 a été contaminé avec  $273 \text{ ufc} \pm 64 \text{ ufc/g}$  (209 – 337) de *E. coli* O157 : H7 pathogène.

#### **4. Procédure d'analyse**

L'analyse démarre directement à partir du sac stomacher dans lequel se trouvait les 25g de matrice. Les laboratoires participant uniquement à la détection de *E. coli* O157 :H7 reçoivent les sacs numérotés 1, 2, 3. Les laboratoires qui participent en plus à la détection (et isolement) de STEC reçoivent trois sacs supplémentaires numérotés 4, 5 et 6.

Le laboratoire doit préparer les échantillons de la même manière que lors des analyses de routine.

#### **5. Analyses associées**

Un test de stabilité a été réalisé le 18 mars. Les échantillons ont été analysés en triple. Les échantillons étaient stables.



## 6. Résultats des laboratoires

### Résultats attendus

Echantillons 1 et 6 : *E. coli* O157:H7/25g détecté

présence de STEC (*E. coli* O26 eae + stx1 + stx2 +)/25g

Echantillons 2 et 4 : *E. coli* O157:H7/25g détecté

présence de STEC (*E. coli* O157 eae + stx1 + stx2 +)/25g

Echantillons 3 et 5 : *E. coli* O157:H7/25g non-détecté

absence de STEC/25g

### Résultats des laboratoires

#### Echantillons 1 à 3:

échantillon	<i>E. coli</i> O157H7		
	1	2	3
n° laboratoire			
2	Détecté/25g	Détecté/25g	Non-détecté/25g
4	Détecté/25g	Détecté/25g	Non-détecté/25g
5	Détecté/25g	Détecté/25g	Non-détecté/25g
10	Non-détecté/25g	Détecté/25g	Non-détecté/25g
11	Détecté/25g	Détecté/25g	Non-détecté/25g
17	Non-détecté/25g	Détecté/25g	Non-détecté/25g
21	Détecté/25g	Détecté/25g	Non-détecté/25g
23	Détecté/25g	Détecté/25g	Non-détecté/25g
28	Détecté/25g	Détecté/25g	Non-détecté/25g

... : résultat non conforme

#### Echantillons 4 à 6 :

échantillon	STEC screening											
	4				5				6			
n° labo	eae	stx1	stx2	sérogroupe	eae	stx1	stx2	sérogroupe	eae	stx1	stx2	sérogroupe
2	+	+	+	/	-	-	-	/	+	+	+	/
4	+	+	+	O157	-	-	-	OND	+	+	+	O26 et
17	+	+	+	O157	-	-	-	/	+	+	+	O26 et O157
21	+	+	+	O157	-	-	-	/	+	+	+	O26 et O157



échantillon	STEC isolement									
	4					5				
n° labo	eae	stx1	stx2	sérogroupe	conclusion	eae	stx1	stx2	sérogroupe	conclusion
2	+	+	+	O157	Présence de STEC possédant le gène eae	-	-	-	OND	Absence de STEC
4	+	+	+	O157	Présence de STEC possédant le gène eae	-	-	-	OND	Absence de STEC
17	+	+	+	O157	Présence de STEC possédant le gène eae	/	/	/	/	Absence de STEC
21	+	+	+	O157 : H7	Présence de STEC possédant le gène eae	/	/	/	/	Absence de STEC

échantillon	STEC isolement				
	6				
n° labo	eae	stx1	stx2	sérogroupe	conclusion
2	+	+	+	O26	Présence de STEC possédant le gène eae
4	+	+	+	O26	Présence de STEC possédant le gène eae
17	+	+	+	O26	Présence de STEC possédant le gène eae
21	+	+	+	O26	Présence de STEC possédant le gène eae

+ : détection

- : non détection

OND : sérogroupe non déterminé

/ : non réalisé

■ : résultat non conforme



## 7. Discussion

Pour la partie « détection *E. coli* O157 :H7 » :

Les laboratoires 10 et 17 ont eu un résultat faux-négatif pour l'échantillon 1.

Le laboratoire 10 a utilisé un kit commercial et bien que les instructions du fournisseur ont été correctement suivies, *E. coli* O157 n'a pas pu être détecté. Malgré que les méthodes alternatives qui sont sur le marché sont validées ISO 16140, leur performance peut tout de même varier en fonction de la matrice analysée.

Le laboratoire 17 a utilisé la méthode ISO/TS 13136 destinée à la détection des STEC pour détecter *E. coli* O157 :H7 et *E. coli* STEC. Pour la détection de *E. coli* O157:H7, pour l'isolement, le laboratoire n'a pas suivi la norme ISO 16654 (détection *E. coli* O157 :H7) ou une autre méthode alternative validée ISO 16140-2, comme le demande la norme ISO/TS 13136.

Tous les laboratoires ont détecté *E. coli* O157 : H7 dans l'échantillon 2.

Il faut remarquer que les 2 laboratoires ayant obtenu un résultat faux-négatif pour l'échantillon 1 obtiennent un résultat correct pour l'échantillon 2 qui était contaminé uniquement avec *E. coli* O157 :H7.

Il n'y a aucun résultat faux-positif pour l'échantillon 3.

Pour la partie « détection de STEC » :

En ce qui concerne la détection et l'isolement de STEC, tous les laboratoires effectuant l'analyse ont détecté et isolé les STEC.

Le laboratoire 4 a eu un résultat faux-négatif au niveau du screening pour la détection du sérotype O157 dans l'échantillon 6. Sans cette information, le laboratoire n'a donc pas pu suivre la norme ISO 16654 (détection *E. coli* O157 :H7) ou une autre





Rapport final essai d'aptitude *E. coli* pathogène 2015 | LNR Microbiologie alimentaire |  
méthode alternative validée ISO 16140-2 pour l'isolement, comme le demande la norme ISO/TS 13136.

Le laboratoire 17 a bien détecté le sérotype O157 au niveau du screening mais, pour l'isolement, n'a pas suivi la norme ISO 16654 (détection *E. coli* O157 :H7) ou une autre méthode alternative validée ISO 16140-2, comme le demande la norme ISO/TS 13136.

## 8. Conclusions

Le choix de la matrice « graines germées » découle du nouveau critère microbiologique du règlement européen n°209/2013 qui amende le règlement 2073/2005, sur l'absence de VTEC O157, O26, O111, O103, O145 et O104:H4 dans 25g de graines germées selon la norme ISO/TS 13136.

Selon les nouvelles règles européennes, les laboratoires impliqués dans le contrôle officiel des denrées alimentaires doivent être préparés à tester les graines germées pour la présence de VTEC.

Les graines germées sont une matrice très complexe car elle contient beaucoup de flore annexe. La méthode d'analyse utilisée a donc toute son importance. Selon le milieu d'enrichissement, la réalisation d'une séparation immuno-magnétique ou non, le milieu d'isolement utilisé, la croissance du pathogène recherché et son isolement (autant *E. coli* O157 :H7 que les STEC) sont favorisés ou non par rapport à cette flore annexe.

Les normes ISO/TS13136, ISO 16654, ou les kits commerciaux validés ISO 16140 recommandent de plus d'utiliser des milieux d'enrichissement (EPT et/ou mTSB) supplémentés en novobiocine, acriflavine ou autres pour les matrices contenant beaucoup de flore annexe.

Comme déjà mentionné plus haut, il faut être prudent avec les méthodes alternatives validées selon l'ISO 16140 qui sont sur le marché car leur performance peut tout de même varier en fonction de la matrice analysée. Il est donc important que le



Rapport final essai d'aptitude *E. coli* pathogène 2015 | LNR Microbiologie alimentaire |  
laboratoire évalue bien les matrices qu'il analyse et réalise une vérification si  
considérée comme nécessaire.

Les résultats des essais d'aptitude sont encodés automatiquement par l'ISP via le logiciel PT-scheme dans la base de données de l'AFSCA, les laboratoires participants ne doivent donc plus le faire.

Un rapport intermédiaire a été envoyé à chaque laboratoire en version électronique le 24 avril 2015. Le rapport final est envoyé le 5 juin en version électronique et envoyé par la poste sur demande.

Le prochain essai d'aptitude « détection » sera organisé en mars – avril 2016.