

RAPPORT FINAL

ESSAI D'APTITUDE EN MICROBIOLOGIE ALIMENTAIRE

PT 1 – 2016 DÉTECTION DE *E. COLI* PATHOGÈNE, *E. COLI* O157:H7 ET *YERSINIA ENTEROCOLITICA* DANS LA VIANDE HACHÉE

MARS 2016

Ce rapport est distribué par l'ISP exclusivement aux participants de cet essai d'aptitude. L'ISP décline toute responsabilité quant à l'utilisation de ce document par ses détenteurs. Les destinataires de ce rapport sont les seuls responsables de son usage.

Section: Pathogènes alimentaires

Auteur : M. Polet

Responsable scientifique : M. Polet

Responsable technique : W. Boukhouchi

Approbation scientifique : N. Botteldoorn

Rue J. Wytsman 14

1050 Bruxelles | Belgique

www.wiv-isp.be



Cet essai d'aptitude portait sur la détection de *E. coli* O157:H7, des *E. coli* productrices de shiga-toxines (STEC) et de *Y. enterocolitica* dans une matrice alimentaire naturellement contaminée en flore mésophile. Cette année, la matrice choisie était la viande hachée de porc et boeuf.

Cette étude a été organisée par le Laboratoire National de Référence (LNR) en microbiologie alimentaire en collaboration avec l'AFSCA et était destinée aux laboratoires agréés par l'AFSCA.

1. Déroulement de l'étude

mardi 15 mars 2016	<ul style="list-style-type: none">• préparation et inoculation des échantillons• transport des colis par un chauffeur de l'ISP vers les 2 centres de dispatching (Melle et Gembloux)
mercredi 16 mars 2016	laboratoires débutent les analyses
mercredi 30 mars 2016	date limite pour la soumission des résultats
lundi 18 avril 2016	rapport intermédiaire envoyé aux laboratoires par l'ISP
jeudi 30 juin 2016	rapport final envoyé aux laboratoires par l'ISP

Chaque colis contenait :

- 3 sacs stomacher (1, 2, 3) contenant chacun 10g de viande hachée pour la détection de *Y. enterocolitica*
- 3 sacs stomacher (4, 5, 6) contenant chacun 25g de viande hachée pour la détection de *E. coli* O157:H7
- 3 sacs stomachers supplémentaires (7, 8 et 9) contenant chacun 25g de viande hachée 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.

5 laboratoires ont effectué la détection de *Y. enterocolitica*.

6 laboratoires ont effectué la détection (et l'isolement) de STEC.

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

1 laboratoire externe-témoin a effectué l'ensemble de l'essai d'aptitude.

2. Matériel et méthode de contamination

Matériel

- Souches utilisées : *Y. enterocolitica* pathogène, *E. coli* O157 : H7 non pathogène (*stx* - , *eae* + , *ehx* +) (origine EH 630 AZ VUB) et 2 souches pathogènes : *E. coli* O157:H7 (*stx1* + *stx2* + *eae* +) TIAC 3269 (origine EURL STEC) = souche 1 , *E. coli* O157:H7 (*stx1* + *stx2* + *eae* +) TIAC 777 (origine WIV-ISP) = souche 2,
- BHI de *E. coli* O157:H7 non pathogène, DO = 1 dilué jusqu'à la dilution 10^{-4} et 10^{-6} dans de l'eau peptonée tamponnée



Rapport final PT 1 - 2016 Détection viande | LNR Microbiologie alimentaire |

- BHI de *E. coli* O157:H7 pathogène souche 1, DO = 1 dilué jusqu'à la dilution 10^{-4} dans de l'eau peptonée tamponnée
- BHI de *E. coli* O157:H7 pathogène souche 2, DO = 1 dilué jusqu'à la dilution 10^{-4} dans de l'eau peptonée tamponnée
- BHI de *Y. enterocolitica* dilué jusqu'à la dilution 10^{-4} dans de l'eau peptonée tamponnée
- 10 g (*Y. enterocolitica*) ou 25 g (*E. coli*) de viande hachée porc et boeuf congelé-décongelé le jour de l'inoculation

Méthode de contamination

Echantillon 1

10 g viande hachée + 100 µl de *Y. enterocolitica* (dilution 10^{-4})

Echantillon 2

10 g viande hachée + 100 µl de *Y. enterocolitica* (dilution 10^{-4})

Echantillon 3

10 g viande hachée

Echantillon 4

25 g viande hachée

Echantillon 5

25 g viande hachée + 100 µl de *E. coli* O157:H7 non pathogène (dilution 10^{-6})

Echantillon 6

25 g viande hachée + 100 µl de *E. coli* O157:H7 non pathogène (dilution 10^{-6})

Echantillon 7

25 g viande hachée + 100 µl de *E. coli* O157:H7 non pathogène (dilution 10^{-4}) + 100 µl de *E. coli* O157:H7 pathogène souche 1 (dilution 10^{-4})



Echantillon 8

25g viande hachée

Echantillon 9

25 g viande hachée + 100 µl de *E. coli* O157:H7 pathogène souche 2 (dilution 10⁻⁴)

3. Taux de contamination

Pour déterminer le niveau de l'inoculum et déterminer la déviation de l'inoculum, les dilutions ont été dénombrées en triple sur une gélose nutritive non sélective : le nutrient agar.

Les échantillons 1 et 2 ont été contaminés avec *Y. enterocolitica* à un niveau de 7179 - 10089 ufc/10g.

Les échantillons 3,4 et 8 n'ont pas été contaminés.

Les échantillons 5 et 6 ont été contaminé avec *E. coli* O157:H7 non pathogène à un niveau de 27- 41 ufc/25g.

L'échantillon 7 a été contaminé avec *E. coli* O157:H7 pathogène souche 1 à un niveau de 3587 – 4987 ufc/25g et avec *E. coli* O157:H7 non pathogène à un niveau de 2933 – 3807 ufc/25g.

L'échantillon 9 a été contaminé avec *E. coli* O157:H7 pathogène souche 2 à un niveau de 4600 – 5640 ufc/25g

4. Procédure d'analyse

L'analyse démarre directement à partir du sac stomacher dans lequel se trouve la matrice. Les laboratoires participant uniquement à la détection de *E. coli* O157 :H7 et de *Y. enterocolitica* reçoivent les sacs numérotés de 1 à 6. Les laboratoires qui en plus participent à la détection (et isolement) de STEC reçoivent trois sacs supplémentaires numérotés 7, 8 et 9.



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

5. Analyses associées

Un test d'homogénéité a été réalisé le 16 mars, jour du début des analyses pour les laboratoires participants. 3 échantillons ont été analysés par type d'échantillon (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9).

Les échantillons étaient stables.

6. Résultats des laboratoires

Résultats attendus

Echantillons 1 et 2 : *Y. enterocolitica* détecté

Echantillon 3: *Y. enterocolitica* non détecté

Echantillons 4 : *E. coli* O157:H7 non détecté

Echantillons 5 et 6 : *E. coli* O157:H7 détecté

Echantillons 7 et 9: présence (présomptive) de STEC possédant le gène eae (*E. coli* O157 eae + stx1 + stx2 +)

Echantillon 8: absence de STEC



Résultats des laboratoires

<i>Yersinia enterocolitica</i>			<i>E. coli</i> O157: H7		
1	2	3	4	5	6
/	/	/	Non détecté/25g	Détecté/25g	Détecté/25g
Détecté/10g	Détecté/10g	Non détecté/10g	Non détecté/25g	Non détecté/25g	Détecté/25g
Non détecté/10g	Non détecté/10g	Non détecté/10g	Non détecté/25g	Détecté/25g	Détecté/25g
/	/	/	Non détecté/25g	Détecté/25g	Détecté/25g
Détecté/10g	Détecté/10g	Détecté/10g	Non détecté/25g	Détecté/25g	Détecté/25g
/	/	/	Non détecté/25g	Détecté/25g	Détecté/25g
Détecté/10g	Détecté/10g	Non détecté/10g	Non détecté/25g	Détecté/25g	Détecté/25g
/	/	/	Non détecté/25g	Détecté/25g	Détecté/25g
Détecté/10g	Détecté/10g	Non détecté/10g	Non détecté/25g	Détecté/25g	Détecté/25g

... : résultat non conforme / : non réalisé

échantillons	STEC screening											
	7				8				9			
n° labo	eae	stx1	stx2	sérogroupe	eae	stx1	stx2	sérogroupe	eae	stx1	stx2	sérogroupe
2	+	+	+	O157	-	-	-	OND	+	+	+	O157
4	+	+	+	/	-	-	-	/	+	+	+	/
5	+	+	+	O157	+	+	+	O157	+	+	+	O157
10	+	+	+	O157	-	-	-	OND	+	+	+	O157 et O26
17	+	+	+	O157	-	-	-	/	+	+	+	O157
21	+	+	+	O157	-	-	-	/	+	+	+	O157


échantillons	STEC isolement											
	7				8				9			
n° labo	eae	stx1	stx2	sérogroupe	eae	stx1	stx2	sérogroupe	eae	stx1	stx2	sérogroupe
2	+	+	+	O157	/	/	/	/	+	+	+	O157
4	+	+	+	O157	/	/	/	/	+	+	+	O157
5	/	/	/	O157	/	/	/	O157	/	/	/	O157
10	+	+	+	O157	/	/	/	/	+	+	+	O157
17	+	+	+	O157	/	/	/	/	+	+	+	O157
21	+	+	+	O157	/	/	/	/	+	+	+	O157

échantillons	STEC conclusion		
	7	8	9
n° labo			
2	Présence de STEC possédant le gène eae	Absence de STEC	Présence de STEC possédant le gène eae
4	Présence de STEC possédant le gène eae	Absence de STEC	Présence de STEC possédant le gène eae
5	Présence de STEC	Présence de STEC	Présence de STEC
10	Présence de STEC possédant le gène eae	Absence de STEC	Présence présomptive de STEC possédant le gène eae
17	Présence de STEC possédant le gène eae	Absence de STEC	Présence de STEC possédant le gène eae
21	Présence de STEC possédant le gène eae	Absence de STEC	Présence de STEC possédant le gène eae

+ : détection

/ : non réalisé

- : non détection

 : résultat non conforme

OND : sérotype non déterminé

7. Discussion

« détection *E. coli* O157:H7 et *Y. enterocolitica* » :

Le laboratoire 4 a obtenu un résultat faux-négatif pour l'échantillon 5 – *E. coli* O157 H7. Le résultat de l'échantillon 6 - *E. coli* O157 :H7 est correct. Ce laboratoire utilise une méthode alternative validée ISO 16140. Le résultat faux-négatif concerne l'étape de screening de la méthode (le kit commercial en lui-même) et non l'étape d'isolement.

Le laboratoire 5 a obtenu deux résultats faux-négatif pour les échantillons 1 et 2 – *Y. enterocolitica*. Il utilise une méthode interne.

Le laboratoire 11 a obtenu un résultat faux-positif pour l'échantillon 3 – *Y. enterocolitica*. Il utilise la norme ISO.

Il n'y a aucun faux-positif pour l'échantillon 4 – *E. coli* O157:H7.

Il n'y a aucun faux-négatif pour l'échantillon 6 – *E. coli* O157:H7.

« détection de STEC » :

1 laboratoire n'a pas effectué la partie isolement.

Le laboratoire 5 a des résultats faux-positif pour les gènes de virulences *stx* 1, *stx* 2, *eae* et pour le sérotype O157 lors de l'étape de screening de la détection pour



l'échantillon 8. Il a aussi un résultat faux-positif pour le sérotype O157 lors de l'étape d'isolement de la détection pour l'échantillon 8. De plus, pour les échantillons 7 et 9, la confirmation utilisée ne respecte pas les exigences de l'ISO/TS 13136:2012. Le laboratoire 10 a un résultat faux-positif pour le sérotype O26 lors de l'étape de screening de la détection.

En ce qui concerne l'expression des résultats (= conclusion), conformément à l'ISO/TS 13136:2012 :

- Pour le laboratoire 5, le résultat ne correspond pas avec les résultats obtenus lors de l'étape de screening pour les échantillons 7, 8 et 9.
- Pour le laboratoire 10, le résultat ne correspond pas avec les résultats obtenus lors de l'étape d'isolement.

8. Conclusions

Les données méthodologiques soumises via l'application web sont d'une grande utilité pour le LNR. En effet, elles permettent parfois d'expliquer certains résultats non conformes et valident à la fois la méthode utilisée.

La matrice « viande hachée » 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 sélectifs pour les matrices contenant beaucoup de flore annexe.

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.



Rapport final PT 1 - 2016 Détection viande | LNR Microbiologie alimentaire |

Un rapport intermédiaire a été envoyé à chaque laboratoire en version électronique le 18 avril 2016. Le rapport final est envoyé le 30 juin 2016 en version électronique et envoyé par la poste sur demande.

Le prochain essai d'aptitude « détection » sera organisé en mars – avril 2017.