

EIND RAPPORT

PROFICIENCY TEST VOOR LEVENS MIDDELENMICROBIOLOGIE JUNI 2013

MATRIX: BANKETBAKKERSROOM

TELLING

Dienst: Voedselpathogenen
Polet Marie
Nadine Botteldoorn
J. Wytsmanstraat 14
1050 Brussel | België

www.wiv-isp.be



Deze inter-laboratorium studie is gericht op de telling van 5 verschillende kiemen in een reële natuurlijke voedingsmatrix. Dit jaar werd er gekozen voor pasteibakkersroom.

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

| | |
|-------------------------|---|
| maandag 17 juni 2013 | Voorbereiding en inoculeren van de pasteibakkersroom stalen |
| dinsdag 18 juni 2013 | Vervoer van de pakketten naar de 2 dispatchingcentra van het FAVV (Melle et Gembloux) door een chauffeur van het WIV en het ophalen van de stalen door de deelnemende laboratoria |
| woensdag 19 juni 2013 | De laboratoria starten de analyses |
| vrijdag 21 juni 2013 | Contact (mail) met de laboratoria om te melden dat er een technische fout is opgetreden tijdens de bewaring van de stalen in het WIV |
| maandag 1 juli 2013 | Limietdatum voor het rapporteren van de resultaten naar het WIV |
| donderdag 18 juli 2013 | Intermediair rapport verstuurd naar de deelnemende laboratoria door het WIV |
| maandag 4 november 2013 | Finaal rapport verstuurd naar de laboratoria door het WIV |

Ieder pakket bevatte:

- 5 staalpotjes (1, 2, 3, 4, 5) met ongeveer 30 g pasteibakkersroom
- Een datalogger voor temperatuursregistratie (Voor enkele laboratoria)
- Een koelelement
- Het nummer van het laboratorium



| | |
|----------------------|----------------------|
| ILVO – VOEDING | Melle |
| SGS | Antwerpen |
| AGROLAB | Battice |
| LOVAP | Geel |
| ECCA | Merelbeke |
| IEM | Liège |
| QUALITY PARTNER | Herstal |
| EURACETA | Villers-le-Bouillet |
| FLVVM | Melle |
| LEQ | Bastogne |
| SERVACO FOOD CONTROL | Wetteren |
| SHA | Mouscron |
| LFSAGx | Gembloux |
| LAVETAN | Turnhout |
| ISP | Brussel |
| BIOTOX | Jabbeke |
| LARECO | Marche-en-Famenne |
| AGRO-ANALYSES | Metz, France |
| CHEMIPHAR | Brugge |
| CVVH | Vorst-Laakdal |
| BRULABO | Brussel |
| CARAH | Ath |
| MICROBIOMETRIX | Sint-Katelijne-Waver |
| HVS | Mons |

24 laboratoria hebben deelgenomen



2. Samenstelling van de stalen

De stalen werden op maandag 17 juni klaargemaakt vertrekkende van pasteibakkersroom in poedervorm aangelengd met melk uit de supermarkt. De artificiële besmetting van de pasteibakkersroom gebeurde direct na de bereiding, dit met de volgende stammen :

| stammen | <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | <i>Bacillus cereus</i> | <i>Listeria monocytogenes</i> | <i>E. coli</i> |
|---------------------------|------------------------------|-------------------------------|------------------------|-------------------------------|----------------|
| Referentie intern | RM LYO 4389 | RM 5325 | RM 6647 | RM 6151 | RM LYO 2329 |
| Referentie internationaal | ATCC 25923 | / | / | / | LMG 8223 |

Deze stammen waren afkomstig van de dienst « kwaliteit van de medische laboratoria ».

Artificiële besmetting van de 5 stalen:

Elk monster werd besmet aan een concentratie van x log cfu/g/kiem (zie tabel 1), om zowel een lage en een middelmatige contaminatie van het staal te bekomen.

Sommige monsters werden niet besmet voor bepaalde parameters = blanco.

Tabel 1: Overzicht van de besmetting van stalen 1-5 met de 5 geselecteerde kiemen (concentratie in log cfu/g)

| | <i>S. aureus</i> | <i>L. monocytogenes</i> | <i>P. aeruginosa</i> | <i>B. cereus</i> | <i>E. coli</i> |
|---|------------------|-------------------------|----------------------|------------------|----------------|
| 1 | 3.28 | 2.92 | 4.04 | blanco | 3.52 |
| 2 | 4.28 | 3.92 | blanco | 4.43 | blanco |
| 3 | 4.30 | blanco | 5.04 | blanco | 4.52 |
| 4 | blanco | 3.92 | 4.04 | 4.43 | 3.52 |
| 5 | 4.30 | blanco | 5.04 | blanco | 4.52 |



Na de besmetting werden de stalen bewaard in de frigo gedurende één nacht waarna ze werden verstuurd.

De initiële concentraties werden gewijzigd door een technische storing van de koelkast waarin ze werden bewaard tijdens de nacht van maandag 17 juni op dinsdag 18 juni.

De stabiliteitsstudie uitgevoerd op woensdag 19 juni op een reeks van stalen kon aantonen dat de concentratie van de verschillende kiemen gestegen was, maar op eenzelfde homogene wijze (zie stabiliteitstest punt 4).

3. Analyse procedure

Voor de 5 stalen dienen de 5 parameters geanalyseerd te worden. De procedure is dezelfde voor ieder staal namelijk :

- . neem een deelmonster van 10 g om de moederoplossing (1/10) te maken
- . voor het vervolg worden de stalen verdund zoals tijdens een routine analyse binnen het laboratorium
- . **Telling** : *Pseudomonas spp*, *L. monocytogenes*, coagulase positieve *Staphylococcus* (CPS), *B. cereus*, *E. coli*

Alle laboratoria hebben de telling van coagulase +*Staphylococcus* uitgevoerd.

Alle laboratoria hebben de telling van *E. coli* uitgevoerd.

1 laboratorium heeft de telling van *B. cereus* niet uitgevoerd

12 laboratoria hebben de telling van *L. monocytogenes* niet gerapporteerd

16 laboratoria hebben de telling van *Pseudomonas spp.* niet gerapporteerd

4. Homogeniteit en stabiliteit test

Nadat de stalen werden bereid op maandag 17 juni, werd de homogeniteit bepaald op 5 herhalingen van de verschillende stalen voor elke parameter. Alle stalen waren homogeen voor alle parameters (zie variatie coëfficiënt hieronder).



De stabiliteitsstest werd uitgevoerd op woensdag 19 juni op de 5 stalen in drievoud.

De parameters waren niet stabiel (zie gemiddelde waarden van stabiliteit hieronder).

Ondanks de onstabieleit waren de stalen toch homogeen besmet (zie CV van stabiliteit hieronder).

| | | Homogeniteit | | Stabiliteit | |
|----------|-------------------------------|----------------------------|------|----------------------------|------|
| | | 17/06/2013 | | 19/06/2013 | |
| | | Gemiddelde in log cfu/g | CV | Gemiddelde in log cfu/g | CV |
| 1 | <i>Bacillus cereus</i> | afwezig | / | afwezig | / |
| | <i>Staphylococcus aureus</i> | 2,86 ± 0.18 | 0,06 | 4.34 ± 0.09 | 0,02 |
| | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 4.18 ± 0.10 | 0,02 | 5.52 ± 0.08 | 0,01 |
| | <i>Listeria monocytogenes</i> | 2.29 ± 0.07 | 0,03 | 4.31 ± 0.11 | 0,03 |
| | <i>Escherichia coli</i> | 2.93 ± 0.04 | 0,01 | 3.59 ± 0.05 | 0,01 |
| 2 | <i>Bacillus cereus</i> | 3.76 ± 0.05 | 0.01 | 4.77 ± 0.15 | 0.03 |
| | <i>Staphylococcus aureus</i> | 3.89 ± 0.10 | 0.03 | 5.39 ± 0.19 | 0.04 |
| | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | afwezig | / | afwezig | / |
| | <i>Listeria monocytogenes</i> | 3.42 ± 0.10 | 0.03 | 5.20 ± 0.03 | 0.01 |
| | <i>Escherichia coli</i> | afwezig | / | afwezig | / |
| 3 | <i>Bacillus cereus</i> | afwezig | / | afwezig | / |
| | <i>Staphylococcus aureus</i> | 3.86 ± 0.08 | 0.02 | 5.45 ± 0.08 | 0.02 |
| | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 5.41 ± 0.19 | 0.04 | 6.65 ± 0.28 | 0.04 |
| | <i>Listeria monocytogenes</i> | afwezig | / | afwezig | |
| | <i>Escherichia coli</i> | 4.12 ± 0.05 | 0.01 | 4.62 ± 0.18 | 0.04 |
| 4 | <i>Bacillus cereus</i> | 3.79 ± 0.05 | 0.01 | 5.30 ± 0.13 | 0.02 |
| | <i>Staphylococcus aureus</i> | afwezig | / | afwezig | / |
| | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 4.53 ± 0.09 | 0.02 | 5.92 ± 0.06 | 0.01 |
| | <i>Listeria monocytogenes</i> | 3.56 ± 0.16 | 0.05 | 5.61 ± 0.10 | 0.02 |
| | <i>Escherichia coli</i> | 3.19 ± 0.02 | 0.01 | 4.24 ± 0.17 | 0.04 |



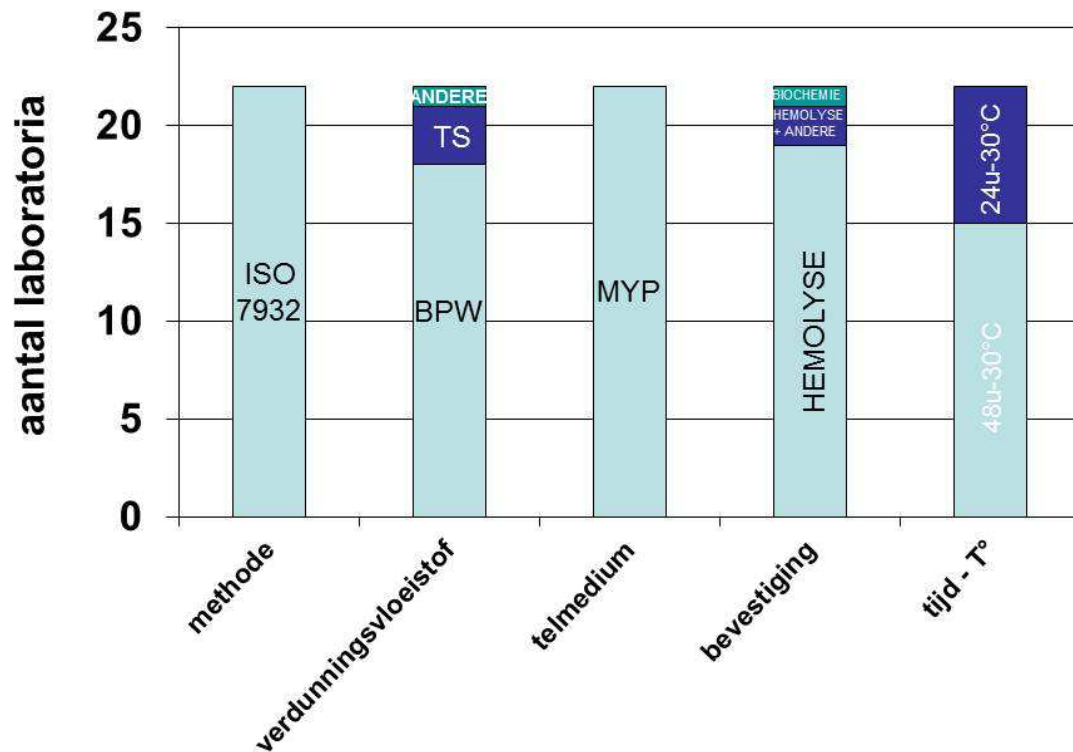
| | | | | | |
|----------|-------------------------------|-------------|------|-------------|------|
| 5 | <i>Bacillus cereus</i> | afwezig | / | afwezig | / |
| | <i>Staphylococcus aureus</i> | 3.87 ± 0.16 | 0.04 | 5.56 ± 0.15 | 0.03 |
| | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 5.19 ± 0.08 | 0.02 | 6.51 ± 0.07 | 0.01 |
| | <i>Listeria monocytogenes</i> | afwezig | / | afwezig | / |
| | <i>Escherichia coli</i> | 4.15 ± 0.03 | 0.01 | 4.86 ± 0.08 | 0.02 |

CV = variatie coëfficiënt

Acceptatiecriteria : CV < 15%

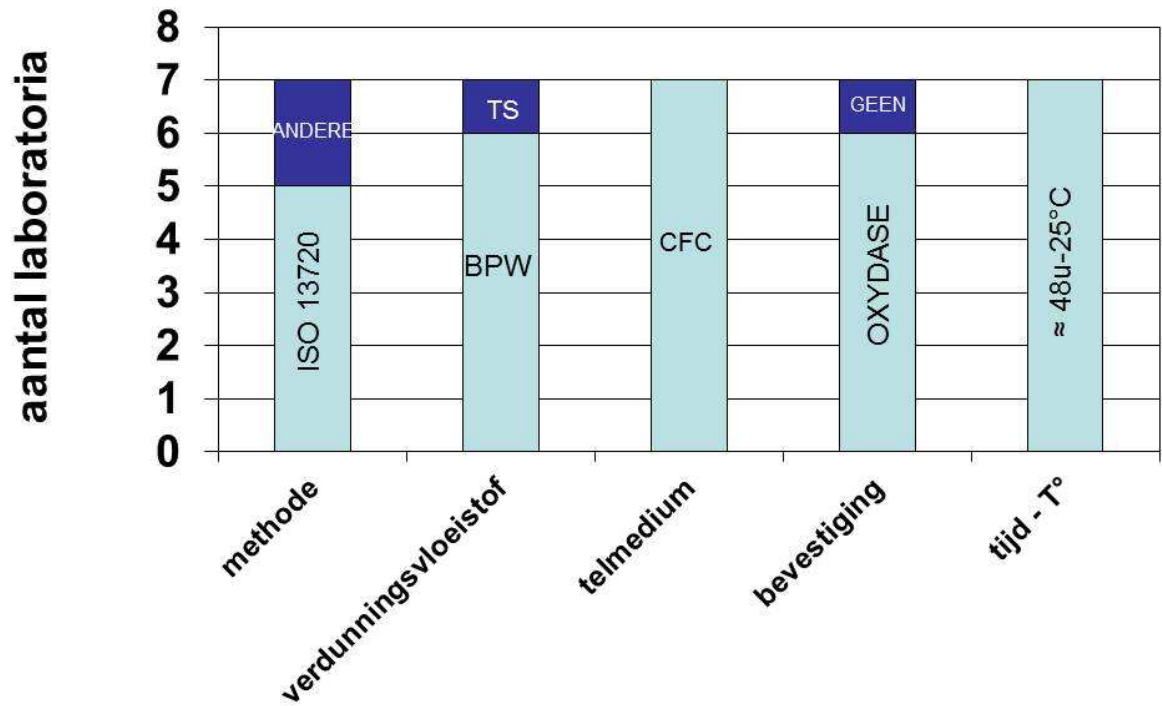
5. Analyse van de resultaten

Bacillus cereus



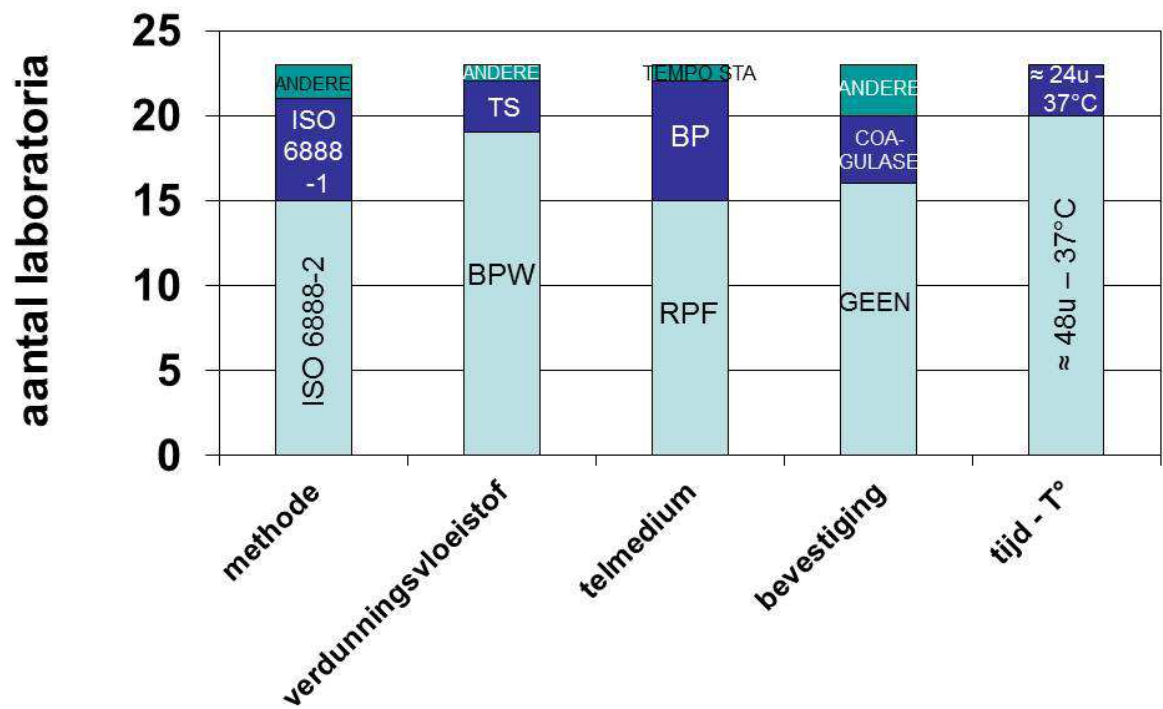


Pseudomonas spp.



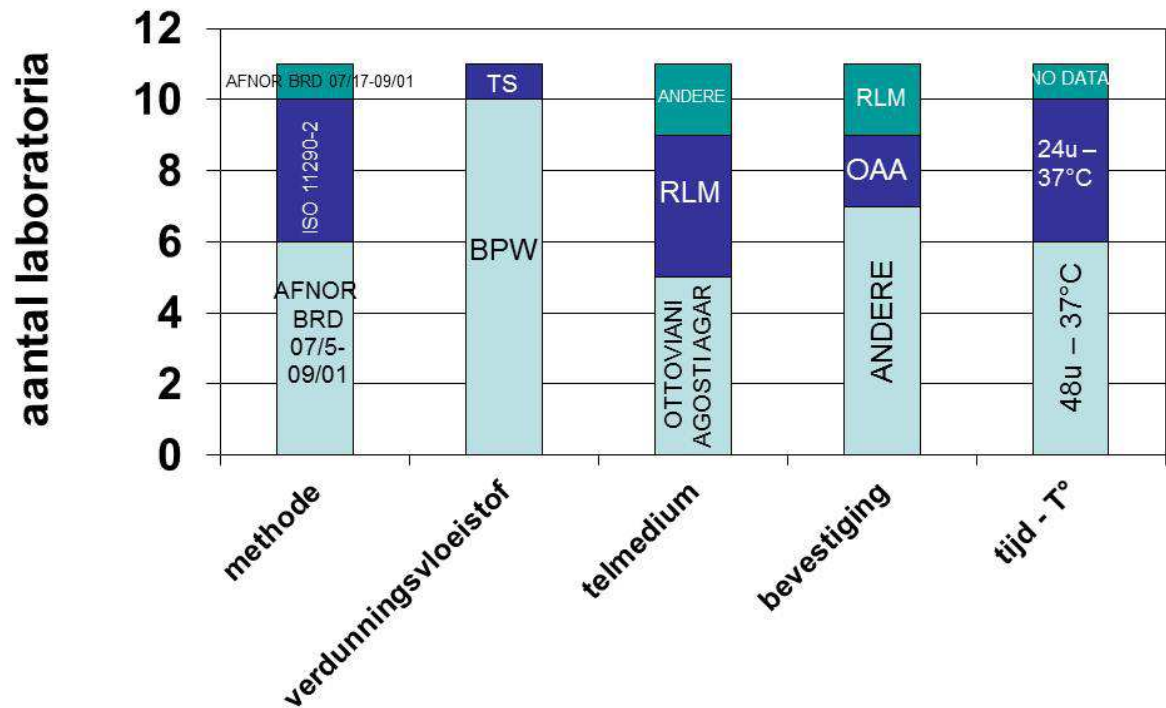


Staphylococcus aureus





Listeria monocytogenes

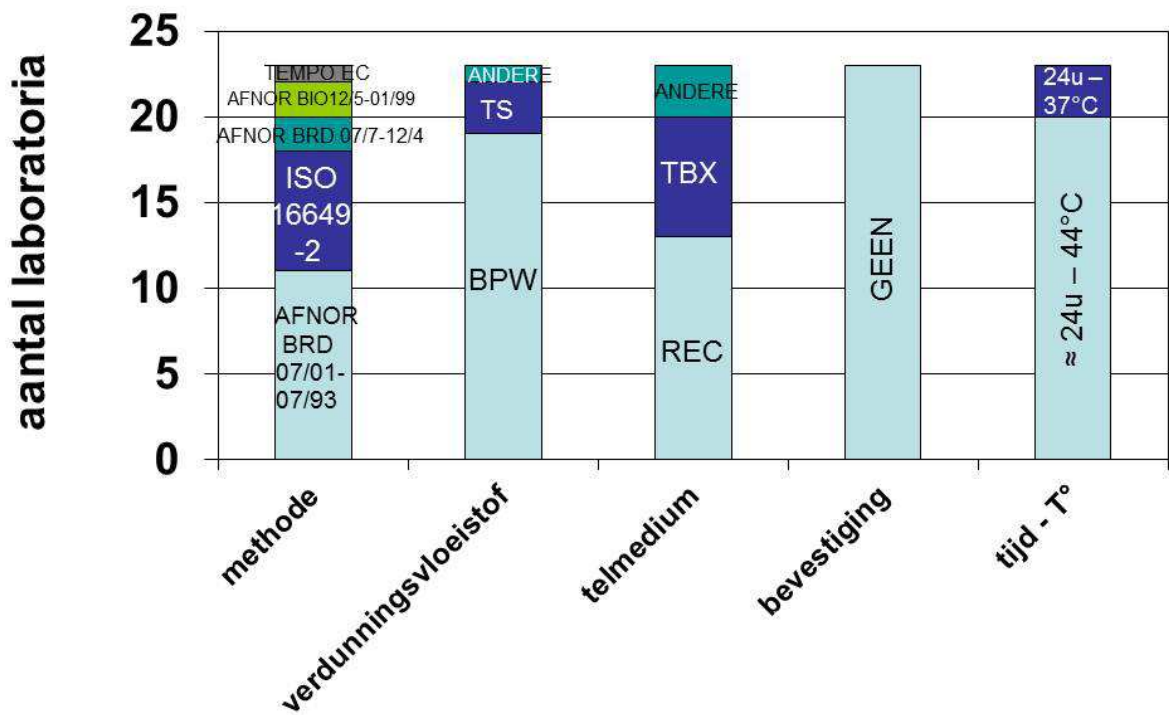


Andere gebruikte bevestigingsmethoden voor *L. monocytogenes* :

- biochemisch 1
- biochemisch+hemolyse 1
- suiker fermentatie 1
- hemolyse 1
- suiker fermentatie + hemolyse + biochemisch 1
- suiker fermentatie + OA agar 1
- biochemisch + hemolyse + Camp test 1



Escherichia coli





6. Performantie van de laboratoria : z-scores

De statistische analyses werden uitgevoerd door de dienst « kwaliteit van de medische laboratoria ».

De z-score per parameter werd berekend op basis van het robuuste gemiddelde en de robuuste standaard deviatie van alle resultaten van de deelnemende laboratoria.

Er werd ook een z-score toegekend aan een vals negatief resultaat.

De resultaten gerapporteerd als « < ... ufc/g » ou « > ... cfu/g » werden niet in rekening gebracht voor de berekening van het robuust gemiddelde. Echter voor de uiteindelijke berekening van de z-scores, werden deze waarden vervangen door de opgegeven waarde (e.g. < 10 cfu/g wordt 10 cfu/g).

Voor de resultaten gerapporteerd als niet telbaar « > ... cfu/g », werd er dus een z-score berekend maar enkel deze groter dan +3 werden weergegeven in het intermediaire verslag.

Overzichtstabel van de z-scores van de laboratoria

CPS = *Staphylococcus aureus*

| n° labo | B.cereus 2 | B.cereus 4 | L. mono 1 | L. mono 2 | L. mono 4 | CPS 1 | CPS 2 | CPS 3 | CPS 5 |
|---------|------------|------------|-----------|-----------|-----------|--------|--------|--------|---------|
| 6 | 0.762 | -0.113 | 0.141 | -0.475 | -0.033 | -0.104 | -0.923 | -1.284 | 0.419 |
| 27 | -1.112 | -0.178 | 0.041 | 0.063 | 0.145 | -0.839 | -0.563 | -1.359 | 0.470 |
| 30 | -0.403 | 1.116 | | | | 0.926 | 0.248 | 0.003 | 0.369 |
| 28 | -0.707 | 2.312 | -1.165 | 0.377 | 0.677 | 0.779 | 0.878 | 0.835 | 0.621 |
| 4 | -0.023 | 1.526 | | | | -1.354 | -0.923 | -0.527 | -1.297 |
| 3 | 1.750 | 1.034 | -1.366 | -0.610 | 0.322 | 0.264 | -0.248 | 0.003 | -0.691 |
| 17 | -0.099 | -0.424 | | | | 0.632 | | -0.073 | |
| 16 | 1.218 | 0.493 | | | | -0.251 | 0.428 | 0.230 | 0.773 |
| 23 | -0.935 | -1.260 | | | | 0.926 | 1.013 | 2.045 | 1.833 |
| 2 | 2.131 | 0.919 | | | | -1.796 | -0.428 | -1.662 | 0.167 |
| 29 | 0.610 | -5.766 | 0.744 | 0.780 | -34.528 | -2.164 | -1.734 | -1.284 | -18.257 |
| 13 | 0.762 | -1.194 | -0.060 | 0.153 | -0.387 | 0.044 | 1.058 | 0.608 | 0.722 |
| 18 | 0.534 | | | | | 6.077 | | | |
| 1 | 0.180 | -0.670 | | | | -0.839 | -0.113 | 0.608 | 0.167 |
| 12 | 0.408 | -0.064 | -1.266 | 1.274 | -0.387 | -0.471 | 0.743 | 0.759 | -1.044 |
| 9 | -0.935 | -1.964 | 0.041 | -2.852 | -3.668 | 0.411 | 1.328 | -0.527 | 0.117 |
| 5 | 0.458 | 0.346 | | | | -0.839 | -1.148 | -3.326 | -1.398 |
| 22 | -0.580 | -0.604 | 0.844 | -0.341 | 0.677 | 1.074 | 0.022 | 0.003 | 0.621 |
| 21 | -1.569 | -0.178 | 0.543 | -0.161 | 0.411 | 1.662 | 0.833 | 1.138 | 1.126 |
| 10 | 0.028 | -0.473 | | | | 1.000 | 0.022 | 0.154 | 0.419 |
| 11 | -3.215 | -0.899 | 3.256 | 1.633 | 2.539 | 0.411 | 0.383 | 0.835 | 0.268 |
| 15 | -0.175 | 0.330 | 0.041 | -1.058 | -1.718 | -0.471 | -0.743 | -0.300 | -1.953 |
| 20 | | | | | | -0.251 | -4.345 | 0.154 | -0.540 |
| 24 | -3.874 | 0.330 | | | | 0.485 | 1.148 | 9.082 | -1.297 |

| | |
|--|--|
| | Z-score tussen 2 en 3 of tussen -2 en -3 |
| | Z-score > 3 of < -3 |
| | niet uitgevoerd |
| | geen z-score want niet telbaar |

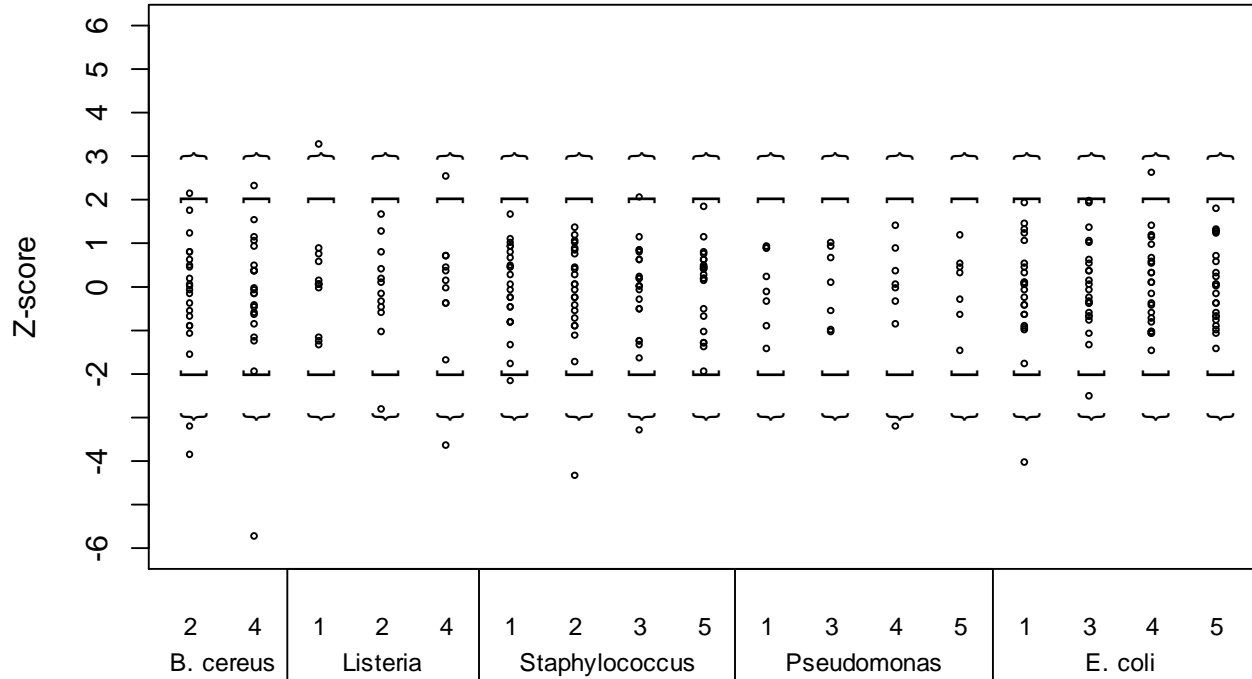


| n° labo | Pseudo 1 | Pseudo 3 | Pseudo 4 | Pseudo 5 | E. coli 1 | E. coli 3 | E. coli 4 | E. coli 5 |
|---------|----------|----------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 6 | | | | | -1.012 | -0.810 | -1.104 | -0.689 |
| 27 | | | | | -0.665 | -0.385 | -0.855 | 0.054 |
| 30 | | | | | 1.037 | -0.268 | 0.090 | 0.212 |
| 28 | 0.861 | 0.988 | 1.409 | 0.430 | 0.438 | 0.981 | 1.110 | 1.248 |
| 4 | | | | | 1.226 | -1.375 | 0.637 | -1.117 |
| 3 | -0.362 | -0.594 | -0.876 | -0.330 | 1.415 | 1.971 | 1.383 | 1.788 |
| 17 | | | | | 0.091 | 0.322 | 0.090 | 0.032 |
| 16 | | | | | 0.280 | -0.103 | -0.183 | -0.419 |
| 23 | | | | | 0.533 | 0.015 | 0.314 | 0.279 |
| 2 | | | | | 0.091 | 0.133 | 0.936 | 1.315 |
| 29 | | | | | -0.098 | 0.604 | 2.602 | -0.779 |
| 13 | 0.205 | 0.657 | 0.038 | 0.518 | -1.800 | 1.052 | 0.513 | 0.685 |
| 18 | | | | | 0.533 | | 0.389 | |
| 1 | | | | | -0.445 | -0.621 | -1.054 | -1.455 |
| 12 | -1.436 | 0.914 | 0.343 | 1.191 | 0.028 | 1.901 | 1.184 | 1.225 |
| 9 | -0.928 | -0.998 | -0.343 | -0.652 | -0.665 | -0.338 | -1.104 | -0.013 |
| 5 | | | | | -0.981 | -2.554 | -1.477 | -1.027 |
| 22 | 0.921 | -1.035 | -3.236 | 0.313 | 1.920 | 0.322 | 0.563 | 0.572 |
| 21 | 0.861 | | 0.876 | | -0.918 | -0.715 | -0.731 | -0.621 |
| 10 | | | | | -0.445 | -0.385 | -1.054 | -0.194 |
| 11 | | | | | -0.287 | -0.715 | -0.407 | -0.419 |
| 15 | -0.123 | 0.068 | -0.038 | -1.471 | 0.028 | 0.534 | -0.432 | -0.689 |
| 20 | | | | | 1.289 | 1.359 | 0.289 | 1.248 |
| 24 | | | | | -4.070 | -1.093 | -0.606 | -0.937 |

| | |
|--|--|
| | Z-score tussen 2 en 3 of tussen -2 en -3 |
| | Z-score > 3 of < -3 |
| | niet uitgevoerd |
| | geen z-score want niet telbaar |



Grafische voorstelling van de z-scores van de verschillende laboratoria



[] limieten z-scores (+2 ; -2)

{ } limieten z-scores (+3 ; -3)

Vals-positief, vals-negatief

Het labo 18 rapporteerde een vals positief resultaat voor *B. cereus* - staal 1

Het labo 18 rapporteerde een vals positief resultaat voor *B. cereus* – staal 3

De laboratoria 18 en 29 rapporteerden een vals positief resultaat *B. cereus* -staal 5

Het labo 29 rapporteerde een vals positief resultaat *L. monocytogenes* - staal 5

Het labo 29 rapporteerde een vals positief resultaat voor *L. monocytogenes*-staal 5

Het labo 29 rapporteerde een vals negatief resultaat *B. cereus* - staal 4



Het labo 29 rapporteerde een vals negatief resultaat voor *L. monocytogenes*-staal4

Het labo 29 rapporteerde een vals negatief resultaat voor Coagulase +
Staphylococcen - staal 5

7. Robuust gemiddelde (X) en robuuste standaardafwijking (SD)

| Kiem (staal) | Robuust X | robuuste SD |
|-----------------------------|------------------|--------------------|
| <i>B. cereus</i> (2) | 5.269 | 0.395 |
| <i>B. cereus</i> (4) | 5.519 | 0.61 |
| <i>L. monocytogenes</i> (1) | 4.716 | 0.1 |
| <i>L. monocytogenes</i> (2) | 5.716 | 0.223 |
| <i>L. monocytogenes</i> (4) | 5.894 | 0.113 |
| <i>Staphylococcus</i> (1) | 4.654 | 0.136 |
| <i>Staphylococcus</i> (2) | 5.745 | 0.222 |
| <i>Staphylococcus</i> (3) | 5.7 | 0.132 |
| <i>Staphylococcus</i> (5) | 5.617 | 0.198 |
| <i>Pseudomonas</i> (1) | 5.631 | 0.335 |
| <i>Pseudomonas</i> (3) | 6.731 | 0.272 |
| <i>Pseudomonas</i> (4) | 5.995 | 0.131 |
| <i>Pseudomonas</i> (5) | 6.703 | 0.342 |
| <i>E. coli</i> (1) | 4.291 | 0.317 |
| <i>E. coli</i> (3) | 5.344 | 0.424 |
| <i>E. coli</i> (4) | 4.704 | 0.402 |
| <i>E. coli</i> (5) | 5.386 | 0.444 |

Hierbij een illustratieve vergelijkingstabel voor de robuuste standaardafwijking (robuuste SD) van deze test met die van RAEMA 38 en 44 en de ringtest van juni 2012 georganiseerd door het WIV.

| | Gemiddelde robuuste SD WIV 2012 | Gemiddelde robuuste SD WIV juni 2013 | Gemiddelde robuuste SD RAEMA 38 | Gemiddelde robuuste SD RAEMA 44 |
|-------------------------|--|---|--|--|
| <i>B. cereus</i> | 0,26 | 0,5 | 0,25 | / |
| CPS | 0,15 | 0,17 | 0,15 | 0,22 |
| <i>L. monocytogenes</i> | 0,13 | 0,15 | / | 0,14 |
| <i>Pseudomonas spp</i> | 0,5 | 0,27 | / | / |
| <i>E. coli</i> | 0,18 | 0,4 | 0,28 | 0,17 |



8. Discussie en besluit

Zoals altijd merken we een grote diversiteit op van de bevestigingstesten gebruikt voor *L. monocytogenes*.

De robuuste standaarddeviatie van *B. cereus* is hoog. Dit kan misschien verklaard worden door het feit dat het milieu voor de telling van *B. cereus* dat wordt gebruikt door de verschillende laboratoria, MYP, ook de groei toelaat van de nevenflora wat bij deze ringtest wel het geval was. Wanneer de telling van *B. cereus* bemoeilijkt wordt kan de variabiliteit van het resultaat dus ook worden beïnvloed.

Ondanks het technische incident van de bewaringstemperatuur van de stalen voor hun transport kon de performantie van de verschillende resultaten voor de verschillende parameters toch statistisch aanvaardbaar worden berekend.

Alle stalen,

93 % van de resultaten waren aanvaardbaar voor de telling van *B. cereus*

92 van de resultaten waren aanvaardbaar voor de telling van *L. monocytogenes*

99 % van de resultaten waren aanvaardbaar voor de telling van *E. coli*

97 % van de resultaten waren aanvaardbaar voor de telling van *Pseudomonas spp.*

95 % van de resultaten waren aanvaardbaar voor de telling van coagulase positieve *Staphylococcus*

Een tussentijdsrapport met de individuele resultaten per laboratorium werd op 18 juli 2013 elektronische verzonden. Het finale rapport werd elektronische verzonden op 4 november 2013. Een papieren versie is ook verzonden met het tussentijdsrapport in bijlage.

Een nieuw ringtest « telling » werd eind oktober 2013 georganiseerd in dezelfde matrix voor de parameters *Listeria monocytogenes* en *Pseudomonas spp.*



De ringtest « telling » voor een verschillende matrix zal terug worden georganiseerd in juni 2014.