

**EIND RAPPORT**

**PROFICIENCY TEST VOOR  
LEVENS MIDDELENMICROBIOLOGIE  
JUNI 2014**

**MATRIX: VERSE KAAS**

**TELLING**

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

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

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 16 juni 2014	Vorbereiding en inoculeren van de verse kaas stalen
dinsdag 17 juni 2014	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 18 juni 2014	De laboratoria starten de analyses
woensdag 2 juli 2014	Limietdatum voor het rapporteren van de resultaten naar het WIV
maandag 14 juli 2014	Intermediair rapport verstuurd naar de deelnemende laboratoria door het WIV
donderdag 30 oktober 2014	Finaal rapport verstuurd naar de laboratoria door het WIV

Ieder pakket bevatte:

- 4 staalpotjes (1, 2, 3, 4) met ongeveer 30 g verse kaas
- Een datalogger voor temperatuursregistratie (voor enkele laboratoria)
- Een koelelement
- De instructies



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
WIV	Brussel
BIOTOX	Jabbeke
LARECO	Marche-en-Famenne
EUROFINS	Brugge
BRULABO	Brussel
CARAH	Ath
HVS	Mons

21 laboratoria hebben deelgenomen



## 2. Samenstelling van de stalen

De stalen werden op maandag 16 juni klaargemaakt met verse kaas aangekocht in de supermarkt. De artificiële besmetting gebeurde direct 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	positieve controle	positieve controle	RM 6151	positieve controle
Referentie internationaal	ATCC 25923	LMG 6395	ATCC 14579	/	ATCC 25922

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

### Artificiële besmetting van de 4 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 1-4 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	3.04	1.64	/	/	3.52
2	/	2.64	2.87	3.75	2.52
3	3.04	/	2.87	/	1.52
4	4.04	2.64	3.87	4.75	/



### 3. Analyse procedure

Voor de 4 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*, en *E. coli*

Alle laboratoria hebben de telling van Coagulase + Staphylococcen, *Listeria monocytogenes* en *E. coli* uitgevoerd.

2 laboratoria hebben de telling van *B. cereus* niet uitgevoerd.

8 laboratoria hebben de telling van *Pseudomonas spp.* niet uitgevoerd.

### 4. Homogeniteit en stabiliteit test

Nadat de stalen werden bereid op maandag 16 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 18 juni op 5 stalen in drievoud. De waarden waren stabiel (zie gemiddelde waarden van stabiliteit hieronder), behalve voor *B. cereus* die in het stalen 2 en 4 niet stabiel is en onder de detectielimiet van < 10 kve/g zakt. Ook de stalen 1, 3 en 4 besmet met *S. aureus* blijken niet stabiel te zijn en zijn met een factor 1,5 – 2 log cfu/g gedaald. Ondanks de onstabieliteit voor deze twee parameters waren de stalen nog homogeen besmet (zie CV van stabiliteit *S. aureus* hieronder).



Ondanks de vele preliminaire testen waren we niet in staat om *B. cereus* stabiel te houden gedurende 2 dagen in deze matrix. De verse kaas is een zure matrix (pH = 4.48) wat misschien kan verklaren waarom deze bacteriën onstabiel zijn.

		Homogeniteit		Stabiliteit	
		16/06/2014		18/06/2014	
		Gemiddelde in log kve/g	CV	Gemiddelde in log kve/g	CV
<b>1</b>	<i>Bacillus cereus</i>	afwezig	/	afwezig	/
	<i>Staphylococcus aureus</i>	3.57 ± 0.12	0.03	niet bepaald	/
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	afwezig	/	afwezig	/
	<i>Listeria monocytogenes</i>	2.04 ± 0.08	0.04	2.01 ± 0.08	/
	<i>Escherichia coli</i>	3.63 ± 0.02	0.01	3.29 ± 0.17	/
<b>2</b>	<i>Bacillus cereus</i>	3.33 ± 0.07	0.02	< 10 kve/g	/
	<i>Staphylococcus aureus</i>	afwezig	/	afwezig	/
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.81 ± 0.29	0.10	2.89 ± 0.04	/
	<i>Listeria monocytogenes</i>	3.19 ± 0.05	0.02	3.12 ± 0.05	/
	<i>Escherichia coli</i>	2.81 ± 0.05	0.02	2.65 ± 0.07	/
<b>3</b>	<i>Bacillus cereus</i>	afwezig	/	afwezig	/
	<i>Staphylococcus aureus</i>	3.73 ± 0.06	0.02	niet bepaald	/
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.99 ± 0.29	0.10	2.32 ± 0.27	0.12
	<i>Listeria monocytogenes</i>	afwezig	/	afwezig	/
	<i>Escherichia coli</i>	1.81 ± 0.17	0.09	1.69 ± 0.21	/
<b>4</b>	<i>Bacillus cereus</i>	4.09 ± 0.12	0.03	< 10 kve/g	/
	<i>Staphylococcus aureus</i>	4.62 ± 0.14	0.03	2.74 ± 0.23	0.08
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4.07 ± 0.12	0.03	3.58 ± 0.12	/
	<i>Listeria monocytogenes</i>	3.18 ± 0.02	0.01	3.16 ± 0.02	/
	<i>Escherichia coli</i>	afwezig	/	afwezig	/

CV = variatie coëfficiënt = standaardafwijking/gemiddelde

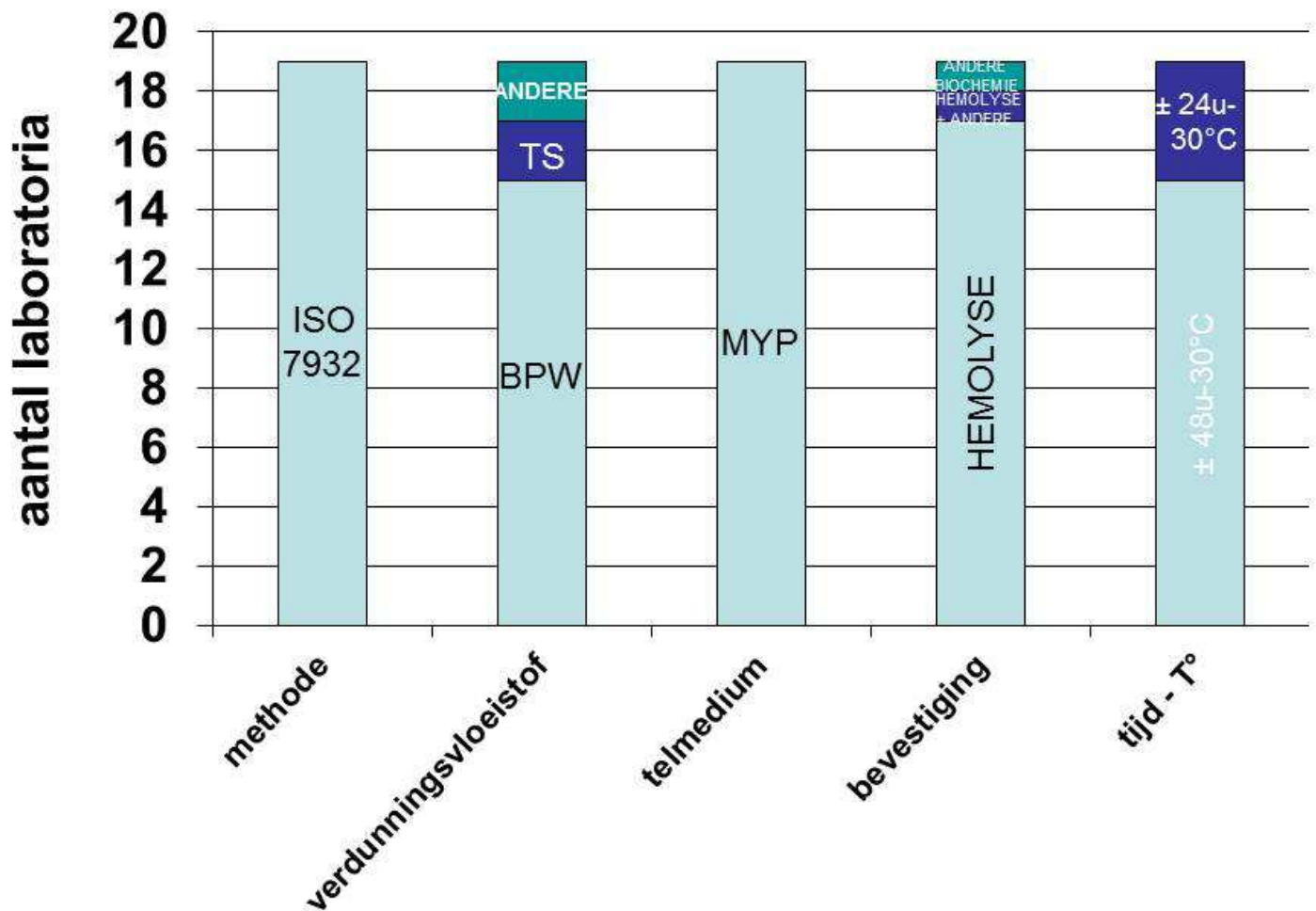


Acceptatiecriteria homogeniteit:  $CV < 15\%$

Acceptatiecriteria stabiliteit: homogeniteit  $\pm 25\%$

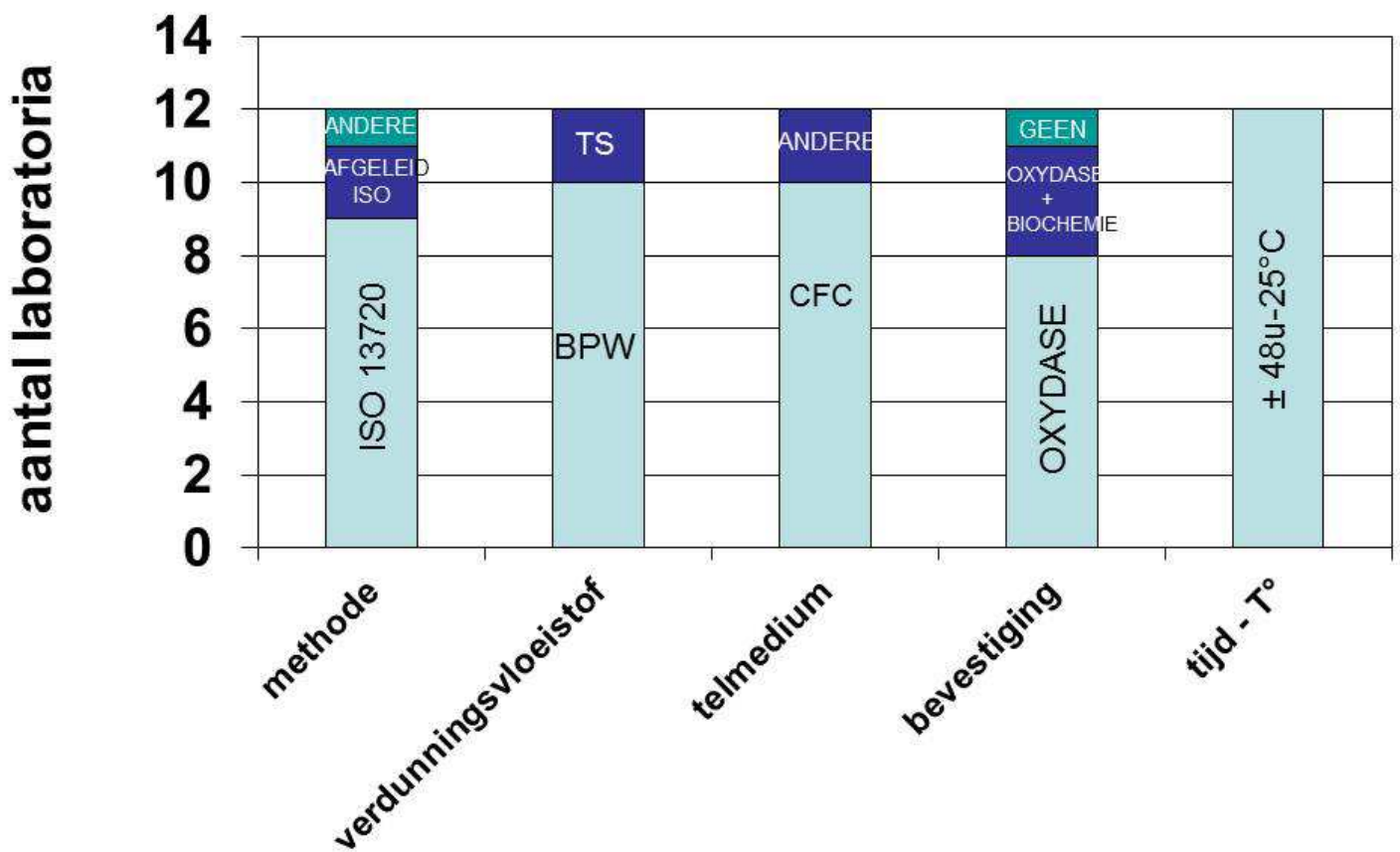
## 5. Analyse van de resultaten

### *Bacillus cereus*





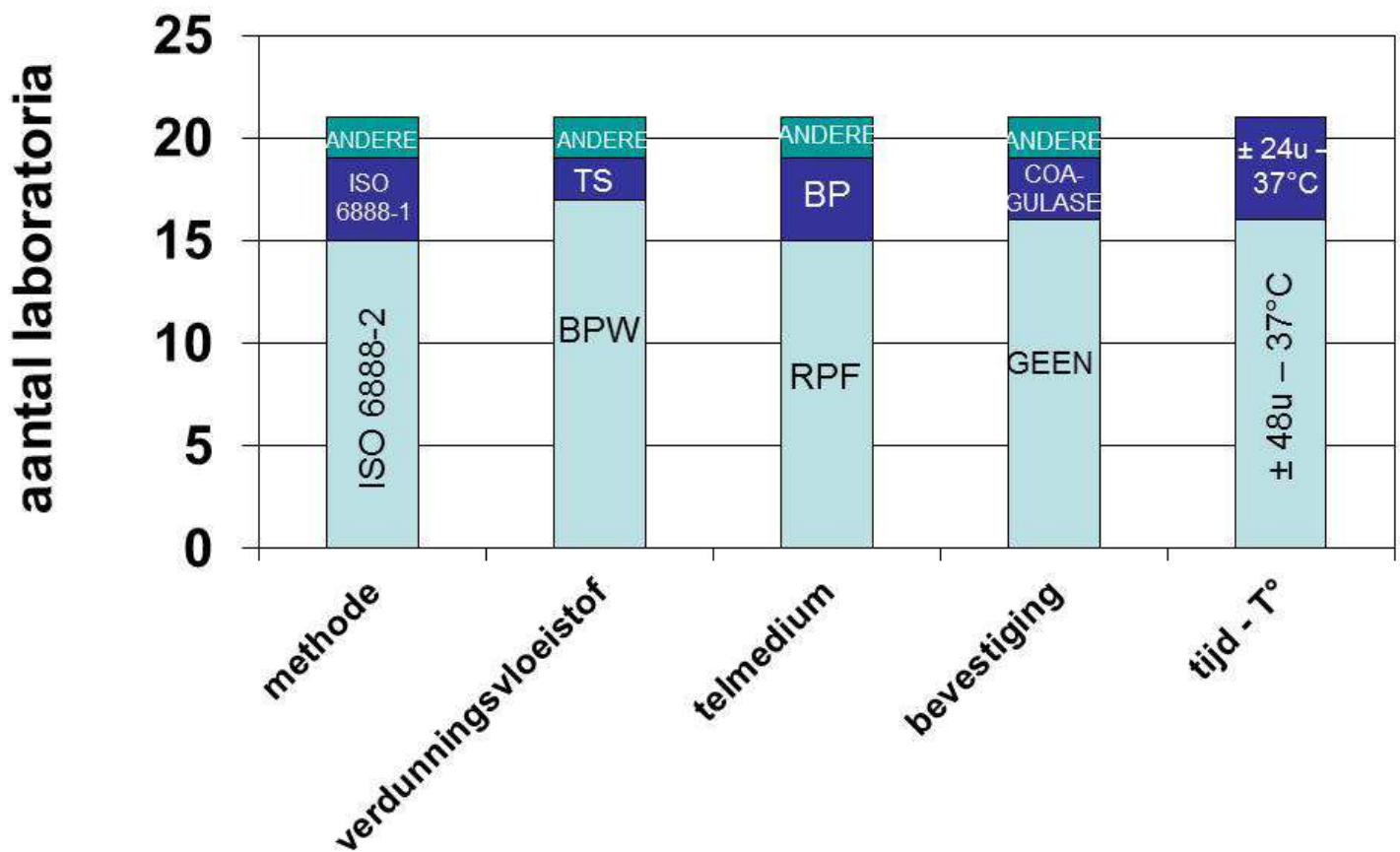
*Pseudomonas spp.*





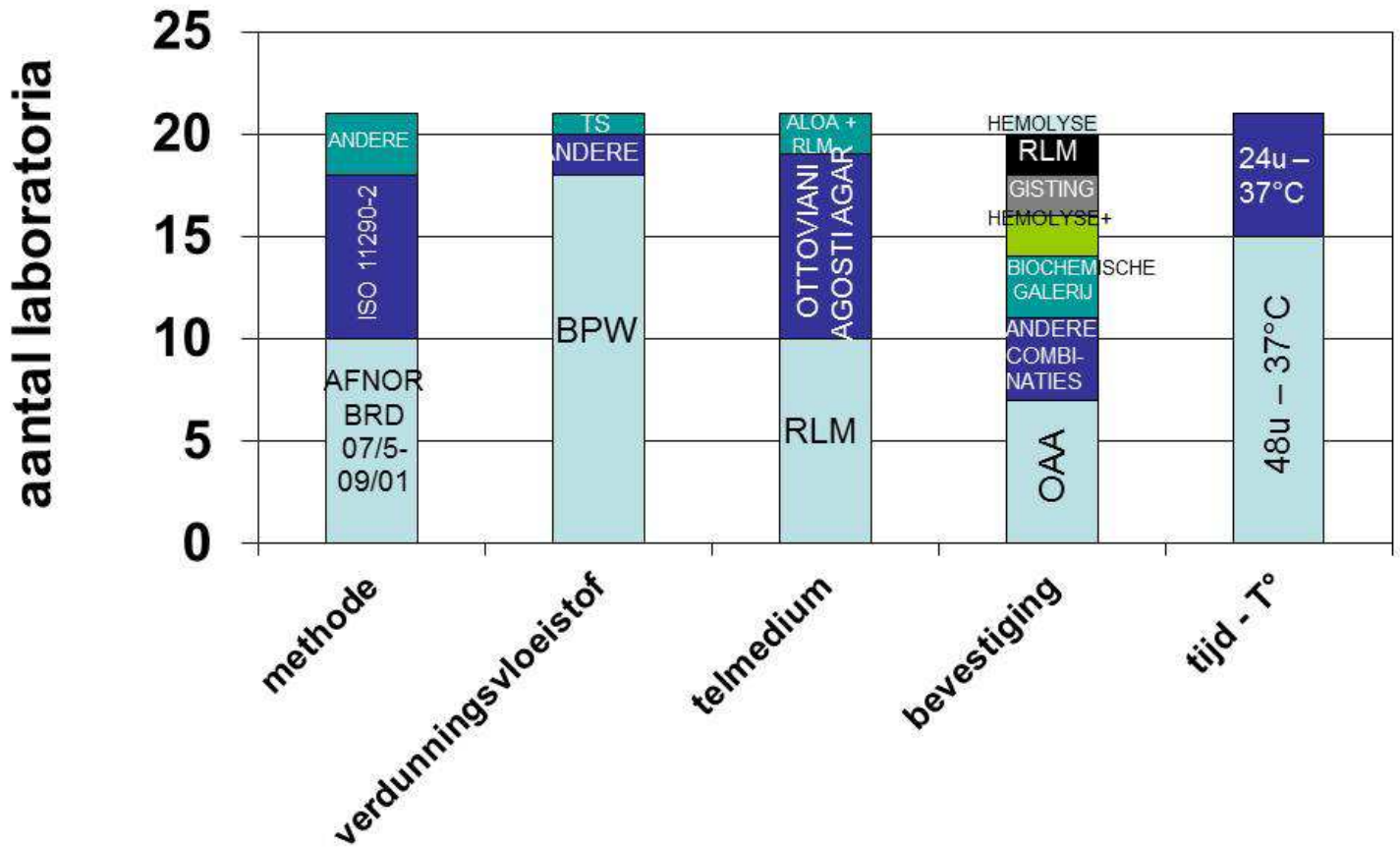


*Staphylococcus aureus*



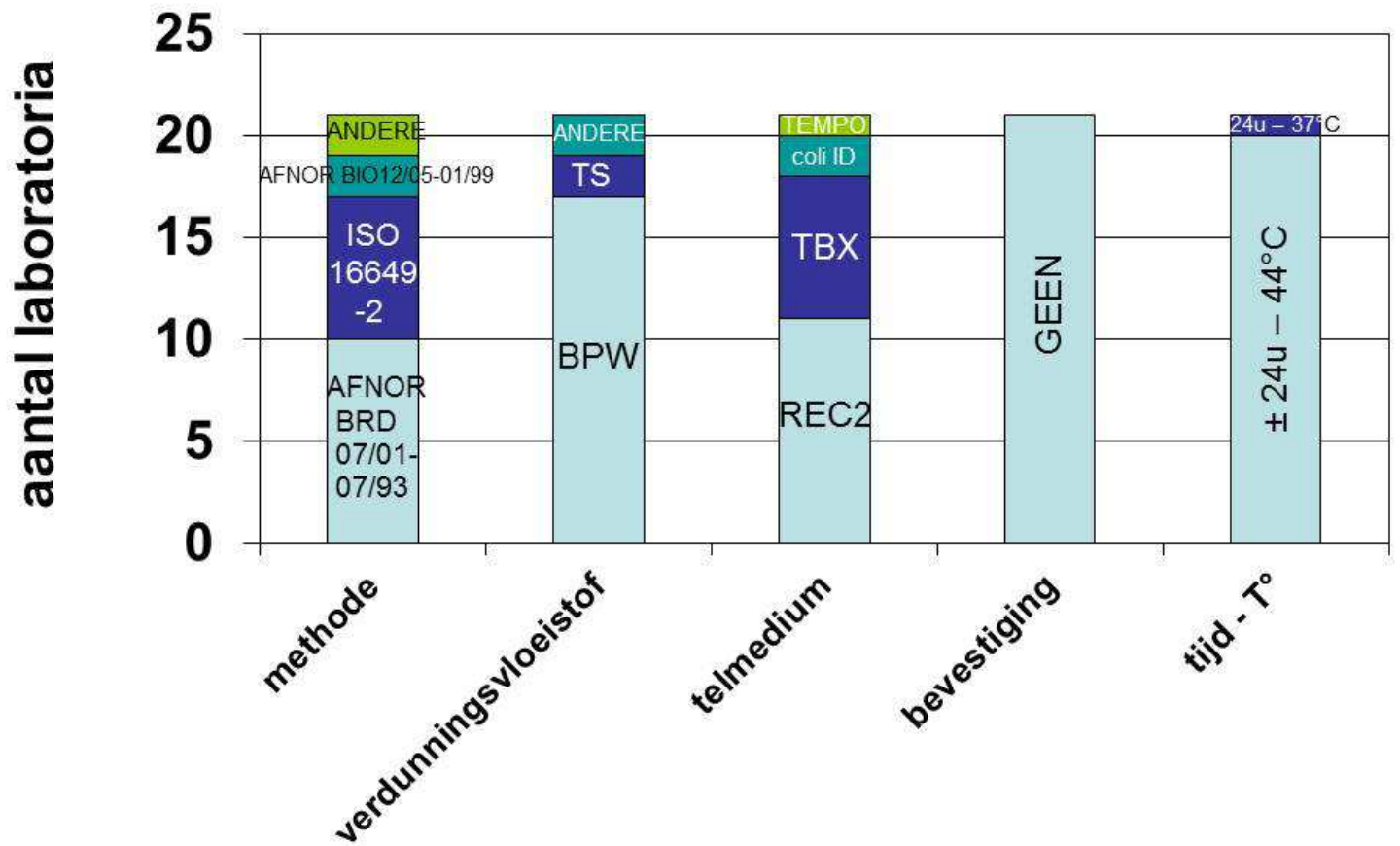


*Listeria monocytogenes*





### *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.

De resultaten gerapporteerd als « < ... ufc/g » werden niet in rekening gebracht voor de berekening van het robuust gemiddelde. Echter een z-score werd berekend met de absolute waarde van de resultaat om de performantie van het laboratorium te verifiëren.

Deze z-score is niet doorgegeven aan het laboratoirum als het resultaat correct is.

### Overzichtstabel van de z-scores van de laboratoria

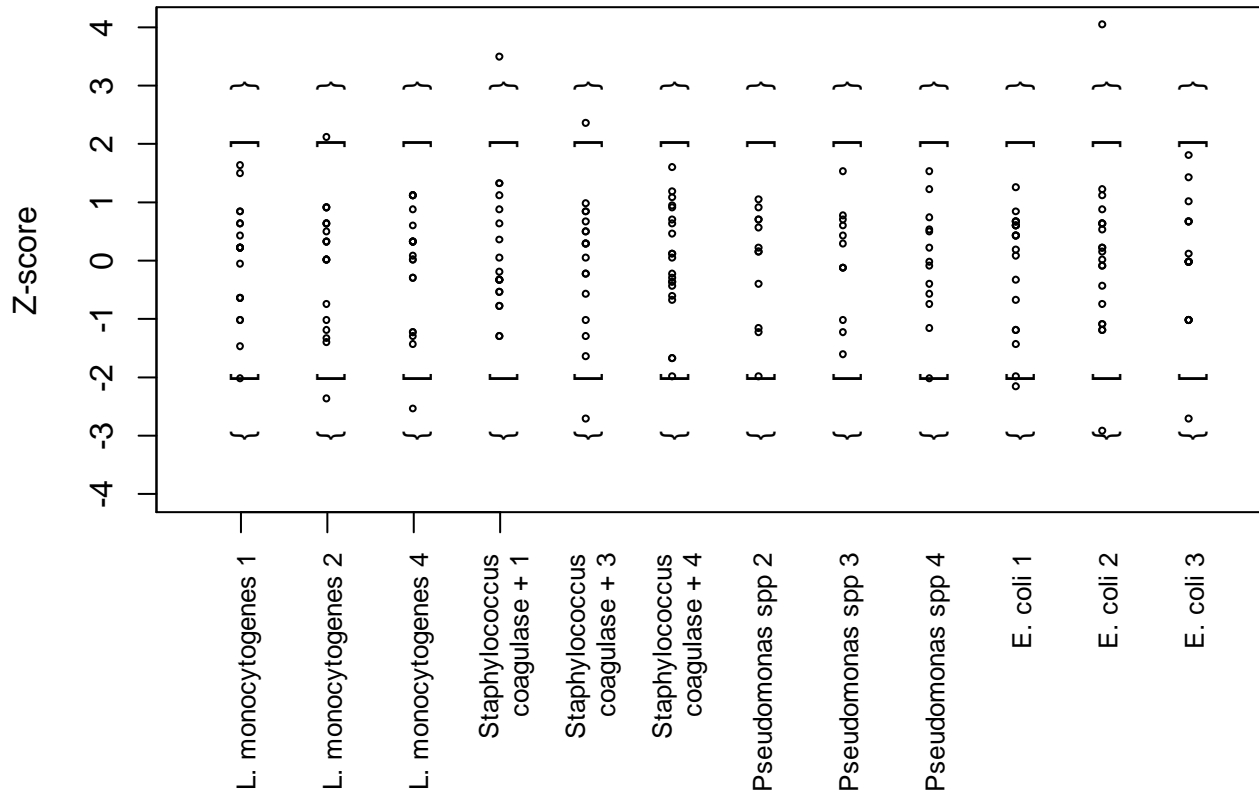
CPS = Coagulase positieve *Staphylococcus*

n° labo	L.mono 1	L.mono 2	L.mono 4	CPS 1	CPS 3	CPS 4	pseudo 2	pseudo 3	pseudo 4	E.coli 1	E.coli 2	E.coli 3
1	0.62	0.31	0.31	1.30	-1.32	-0.38	0.20	0.27	-0.05	-1.21	-1.22	-0.05
2	0.18	-0.02	0.31	-0.20	resultaat "<..."	0.68				0.59	0.14	0.99
3	-1.05	-0.02	0.31	-0.57	0.66	0.10	0.12	-0.14	-0.10	1.24	1.19	1.80
4	-2.03	-1.06	-1.46		0.81	-0.62	-0.42	-0.14	-0.43	0.42	-2.95	-1.04
5	0.82	0.61	1.08	-0.36	-1.04	-0.30	0.15	0.56	0.51	-0.69	-1.10	
6	resultaat "<..."	-1.37	0.59	-0.79		0.10				0.82	0.62	0.65
9	0.18	-1.23	0.01	-0.57	-0.60	-0.71	-1.25	-1.25	-0.76	0.67	0.87	1.43
10	-0.68	-0.76	-1.24	0.01	-2.72	0.90	resultaat "<..."		-2.05	0.15	0.21	-2.73
11	1.60	0.61	1.08	-0.36	0.46	0.43				0.59	-0.76	-0.05
12	-0.68	0.46	0.07	-0.36	-1.66	-0.46				-1.47	-0.10	0.65
13	-0.07	-1.41	-1.32	0.61	0.26	-1.71	0.56	0.74	1.19	0.67	4.02	-0.05
15	0.18	-0.02	-0.32	-0.36	0.46	-1.71				-2.18	-1.22	
16	0.41	0.61	0.31			-0.23	0.70	0.42	0.73	-2.00	0.49	-0.05
17	-1.05	0.90	1.08	3.49	0.95	1.17				0.59	-0.02	0.11
18	0.18	-0.02	0.31	-0.79	0.02	1.06	-2.01	-1.63	-1.19	-0.35	-1.10	
20	0.18	2.11	-1.24	1.30	-0.26	-0.38				0.42	1.09	-0.05
21	0.62	0.90	0.84	0.86	2.33	1.57	0.70	1.52	1.50	-1.21	-0.10	-1.04
22	-0.68	-2.40	-2.58	-1.33	0.26	0.03	-1.17	-1.03	-0.59	0.06	-0.46	-0.05
23	1.47	0.90	-0.32	0.33	0.81	0.94	1.03	0.70	0.48	0.59	0.62	-1.04
27	-1.49	0.31	1.08	-1.33	-0.26	-2.01				0.67	0.21	0.65
28	0.82	0.31	-0.02	1.09	0.26	0.63	0.88	-0.14	0.21	0.42	0.62	-1.04

Z-score tussen 2 en 3 of tussen -2 en -3  
 Z-score > 3 of < -3  
 analyse niet uitgevoerd  
 geen z-score berekent



### 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 10 rapporteerde een vals negatief resultaat voor *Pseudomonas* spp - stalen 2 en 3.



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

Kiem (staal)	robuust X	robuuste SD
<i>L. monocytogenes</i> (1)	1.967	0.18
<i>L. monocytogenes</i> (2)	3.116	0.098
<i>L. monocytogenes</i> (4)	3.078	0.116
<i>Staphylococcus</i> (1)	1.843	0.182
<i>Staphylococcus</i> (3)	1.772	0.283
<i>Staphylococcus</i> (4)	2.524	0.204
<i>Pseudomonas</i> (2)	2.615	0.328
<i>Pseudomonas</i> (3)	2.508	0.222
<i>Pseudomonas</i> (4)	3.428	0.294
<i>E. coli</i> (1)	3.523	0.134
<i>E. coli</i> (2)	2.522	0.163
<i>E. coli</i> (3)	1.486	0.178

Hierbij een illustratieve vergelijkingstabel voor de robuuste standaardafwijking (robuuste SD) van de ringtest van juni 2014 met die van RAEMA 38 en 44 en de ringtesten van juni 2012 en 2013 georganiseerd door het WIV.

	Gemiddelde robuuste SD WIV juni 2014	Gemiddelde robuuste SD WIV juni 2012	Gemiddelde robuuste SD WIV juni 2013	Gemiddelde robuuste SD RAEMA 38	Gemiddelde robuuste SD RAEMA 44
CPS	0,22	0,15	0,17	0,15	0,22
<i>L. monocytogenes</i>	0,13	0,13	0,15	/	0,14
<i>Pseudomonas spp</i>	0,28	0,5	0,27	/	/
<i>E. coli</i>	0,16	0,18	0,4	0,28	0,17

## 8. Discussie en besluit

De matrix “verse kaas” is een matrix die de overleving van *B. cereus* en *S. aureus* niet of weinig ondersteunt, dit is misschien te wijten aan de lage pH van deze matrix.



Alle stalen,

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

92 % van de resultaten waren aanvaardbaar voor de telling van *E. coli*

92 % van de resultaten waren aanvaardbaar voor de telling van *Pseudomonas spp.*

92 % van de resultaten waren aanvaardbaar voor de telling van Coagulase positieve *Staphylococcus*

Een tussentijdsrapport met de individuele resultaten per laboratorium werd op 14 juli 2014 elektronische verzonden. Het finale rapport werd elektronische verzonden op 30 oktober 2014. Een papieren versie is beschikbaar op aanvraag.

De ringtest « telling » voor een verschillende matrix zal terug worden georganiseerd in juni 2015.