

**EINDRAPPORT**

**PROFICIENCY TEST VOOR  
LEVENS MIDDELENMICROBIOLOGIE  
JUNI 2017**

**PT – 2 TELLING IN GROENTEN**

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.

Dienst: Voedselpathogenen  
Auteur van het rapport : Marie Polet  
Wetenschappelijke verantwoordelijke: Marie Polet  
Technische verantwoordelijke: Astrid Huwaert  
Wetenschappelijke goedkeuring: 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 vier verschillende kiemen in een voedingsmatrix die natuurlijk besmet is met een mesofiele flora. Dit jaar werd er gekozen voor erwten.

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

### 1. Verloop van de studie

maandag 12 juni 2017	Voorbereiding en inoculeren van de stalen
dinsdag 13 juni 2017	Transport 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 14 juni 2017	De laboratoria starten de analyses
woensdag 26 juni 2017	Limietdatum voor het rapporteren van de resultaten naar het WIV
donderdag 20 juli 2017	Intermediair rapport verstuurd naar de deelnemende laboratoria door het WIV
vrijdag 23 november 2017	Eindrapport verstuurd naar de laboratoria door het WIV

Ieder pakket bevatte:

- vijf potjes (1, 2, 3, 4, 5) met ongeveer 20 g erwten
- Een datalogger voor temperatuurregistratie (voor de helft van de laboratoria)
- Een koelelement
- De instructies



Deelnemende laboratoria :

ILVO – T&V	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 erwten werden diepgevroren aangekocht in de supermarkt (verschillende loten) en bewaard bij -19°C. Op de dag van de bereiding van de stalen werden de erwten ontdooid gedurende twee uur bij kamertemperatuur en daarna beënt met de verschillende kiemen. De artificiële besmetting gebeurde direct met de volgende stammen :

stammen	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Listeria ivanovii</i>
referentie	TIAC 2473	TIAC 2647	TIAC 2445	TIAC 2481	TIAC 716

Deze stammen zijn afkomstig uit de collectie van het WIV.

### Artificiële besmetting van de vijf stalen:

Elk staal werd beënt om zowel een lage en een middelmatige contaminatie van het staal te bekomen. Het aantal kiemen in het inoculum werd bepaald door een drievoudige uitplating op een non-selectief medium.

Sommige stalen werden niet beënt en dienden als blanco stalen.

Staal 1 : beënt met *B. cereus* en *L. monocytogenes*

Staal 2 : beënt met *E. coli*, *S. aureus* en *L. monocytogenes*

Staal 3 : beënt met *E. coli*, *B. cereus* en *L. ivanovii* (10<sup>3</sup> cfu/g)

Staal 4 : beënt met *E. coli*, *S. aureus* en *L. ivanovii* (10<sup>3</sup> cfu/g)

Staal 5 : beënt met *S. aureus*, *B. cereus* en *L. monocytogenes*

Na de beënting werden de stalen gedurende een nacht in de koelkast bewaard vooraleer ze werden verzonden naar de twee dispatchingcentra.



### 3. Analyse procedure

Voor de vijf stalen dienden de vier parameters geanalyseerd te worden. De procedure voor elk staal is hetzelfde, namelijk :

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

Alle laboratoria hebben de telling van CPS, *L. monocytogenes* en *E. coli* uitgevoerd. Een laboratorium heeft de telling van *B. cereus* niet uitgevoerd.

### 4. Geassocieerde testen

#### ➤ Homogeniteits- en stabiliteitstest

Voor de ringtest werd een homogeniteitstest uitgevoerd om de beëntingstechniek te valideren. Deze test werd uitgevoerd op vijf stalen van elk van de vijf loten voor elke beënt kiem. Deze test werd uitgevoerd 's morgens, twee dagen na bereiding van de stalen. De stalen waren homogeen.

Dezelfde dag van de bereiding van de stalen, op maandag 12 juni, werd het besmettingsniveau bepaald op telkens 1 staal van elk lotnummer voor elke kiem.

De homogeniteitstest werd uitgevoerd, op woensdag 14 juni (J+2), op vijf stalen van elk lot voor elke beënte kiem.

De stalen waren homogeen.

Een stabiliteitstest werd dezelfde dag uitgevoerd tegen het einde van de namiddag om de stabiliteit na te gaan tussen 's morgens en namiddag. De stalen waren stabiel.



➤ Verificatie van de natuurlijke besmetting van de stalen

Voor de besmetting werd één staal per lot (1, 2, 3, 4 en 5) geanalyseerd (telling) voor alle kiemen evenals voor de totale flora. Al de resultaten waren kleiner dan de detectielimiet voor de kiemen van de proficiency test. Ook voor de homogeniteitstest (J+2) werd een telling uitgevoerd voor elk lot voor elke niet-beënte kiem. De resultaten waren kleiner dan de detectielimiet.

### **5. Performantie van de laboratoria : z-scores**

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

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



## Overzichtstabel van de z-scores van de laboratoria

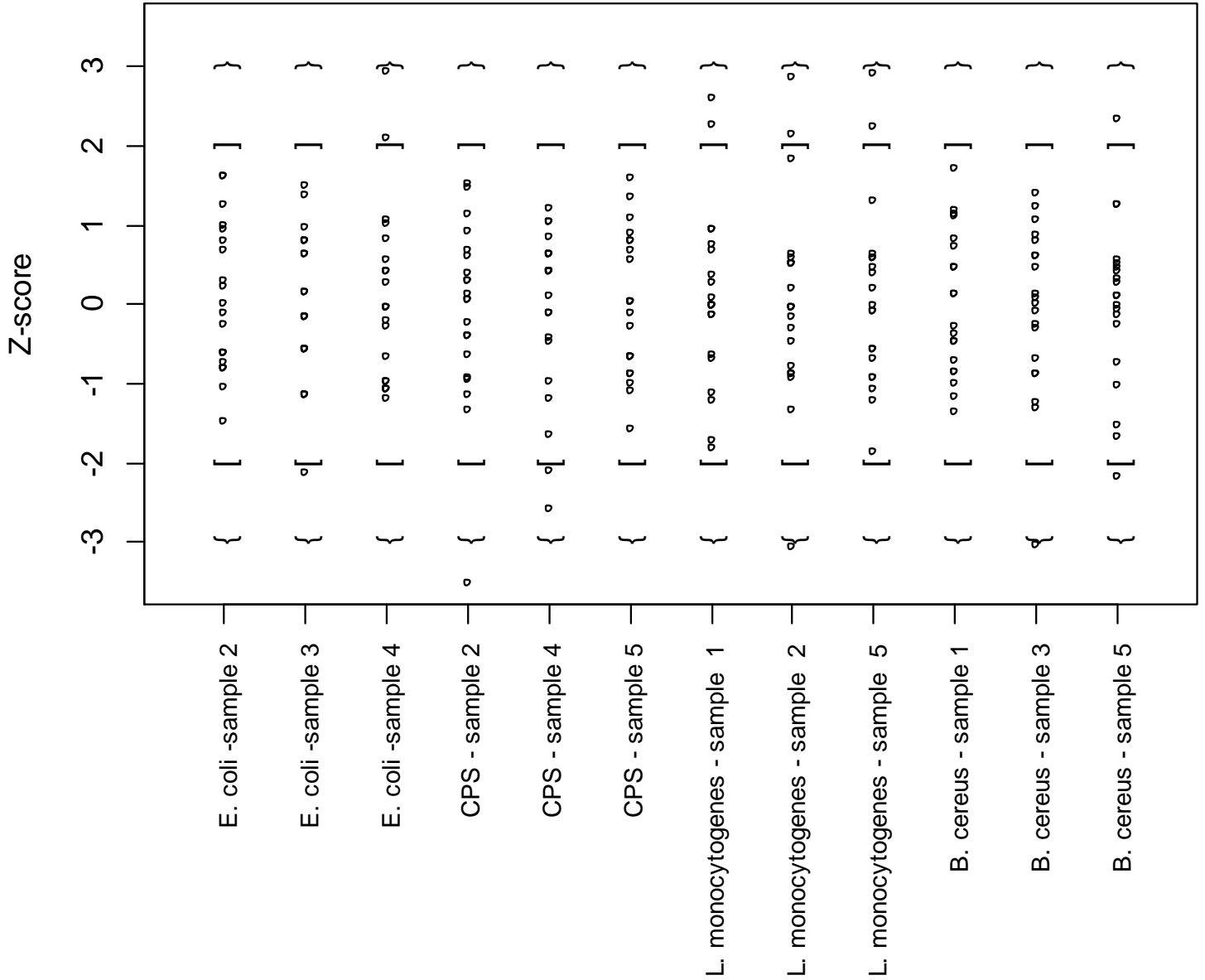
CPS = Coagulase positieve *Staphylococcus*

N° Labo	E. coli 2	E. coli 3	E. coli 4	CPS 2	CPS 4	CPS 5	L. monocytogenes 1	L. monocytogenes 2	L. monocytogenes 5	B. cereus 1	B. cereus 3	B. cereus 5
1	1,62	-1,15	0,28	0,59	-0,10	0,03	-1,11	0,50	0,40	-1,01	0,08	0,32
2	0,79	-2,13	1,07	0,05	0,41	-0,66	-0,02	-0,89	-0,93	1,10	0,79	-0,07
3	-0,80	-0,58	0,42	0,29	0,63	0,68	-0,02	2,15	-0,68	0,72	0,12	0,27
4	-0,80	-1,15	-0,97	-1,16	0,63	-0,99	-1,72	-0,78	-0,57	1,17	-0,27	0,55
5	-0,80	-0,58	1,01	0,29	0,41	-0,88	-0,14	-0,32	-1,07	0,14	-0,32	-0,01
6	0,30	0,81	-0,04	-3,52	1,20	0,79	0,28	-3,06	-1,22	-0,86	-3,05	2,34
9	0,22	1,38	0,56	-0,92	-2,60	-1,09	-0,65	-0,94	0,58	-1,37	-0,70	-0,27
10	1,00	0,14	-1,19	1,13	-0,47	0,56	-1,83	-0,03	0,58	0,46	1,05	-0,14
11	0,01	-0,17	0,42	-0,94	0,41	1,59	0,94	0,59	-0,57	1,72	-0,88	1,24
12	-0,63	-0,58	-1,08	-0,39	-1,19	0,03	2,59	1,84	2,24	0,46	-1,33	-1,04
13	-1,05	0,62	-0,97	-0,24	-0,44	-0,66	-0,14	-0,03	-0,10	-1,18	1,24	-1,52
15	-0,12	-1,15	0,83	-1,33	-2,12	-1,58	0,94	0,50	0,20	-0,72	-0,08	-2,19
16	-0,63	0,81	-0,29	-0,63	-1,66	-0,88	0,68	-0,48	0,46	-0,86	-1,24	-1,67
17	-0,63	-0,58	2,09	0,40	1,03	0,03	-0,02	0,21	0,58	-0,48	0,61	0,11
18	-0,26	0,62	-0,20	0,12	-0,10	-0,12	0,08	0,63	1,30	-0,48	0,00	-0,74
20	1,25	0,14	-1,08	0,05	0,63	0,89	-0,02	-0,03	-0,02			
21	-1,48	1,50	-0,66	1,53	-0,98	0,79	-1,21	-1,33	-1,86	1,13	0,87	0,51
22	1,62	0,98	2,94	0,68	0,84	1,35	2,27	2,87	2,92	-0,28	1,39	0,42
23	0,94	-0,17	-0,04	-0,39	0,11	-0,29	0,75	0,50	0,63	0,81	0,61	0,11
27	0,69	-0,17	-0,04	0,92	1,03	1,09	-0,68	-0,89	-0,93	-0,38	0,45	0,46
28	-0,74	0,81	-1,08	1,47	0,41	-0,66	0,37	-0,17	-0,10	0,14	-0,88	1,24

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



### Grafische voorstelling van de z-scores van de verschillende laboratoria



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

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





### Vals-positieve en vals-negatieve resultaten

Laboratoria 6, 10, 15, 16 en 18 rapporteerden een vals positief resultaat voor *L. monocytogenes*-stalen 3 en 4.

Het laboratorium 6 rapporteerde een vals positief resultaat voor *B. cereus*-stalen 2 en 4.

Het laboratorium 10 rapporteerde een vals positief resultaat voor *B. cereus*-staal 2.

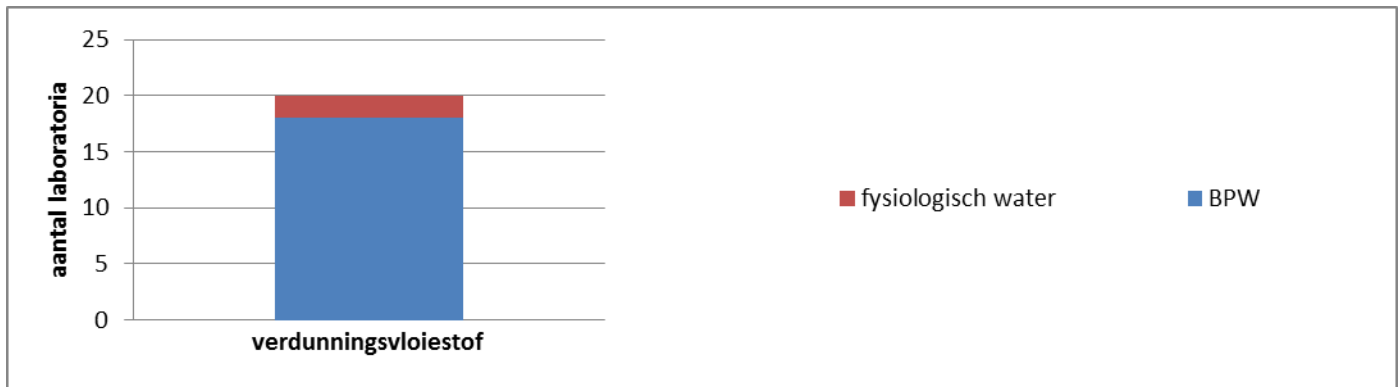
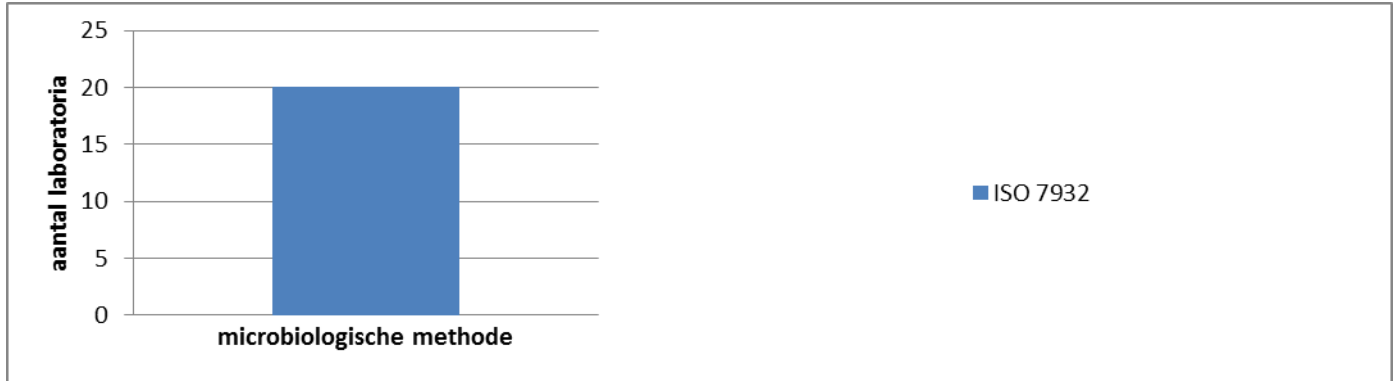
### 6. Robuust gemiddelde (X) en robuuste standaardafwijking (SD)

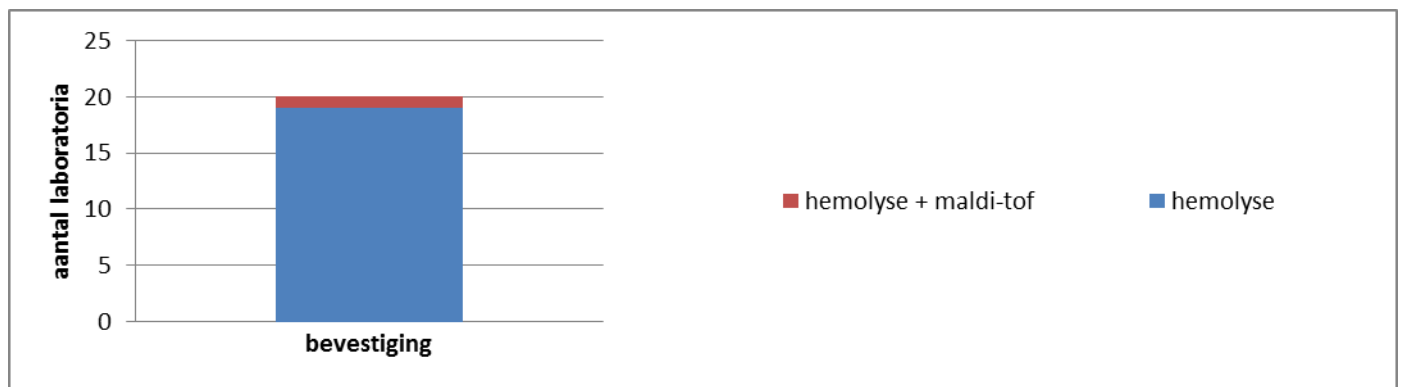
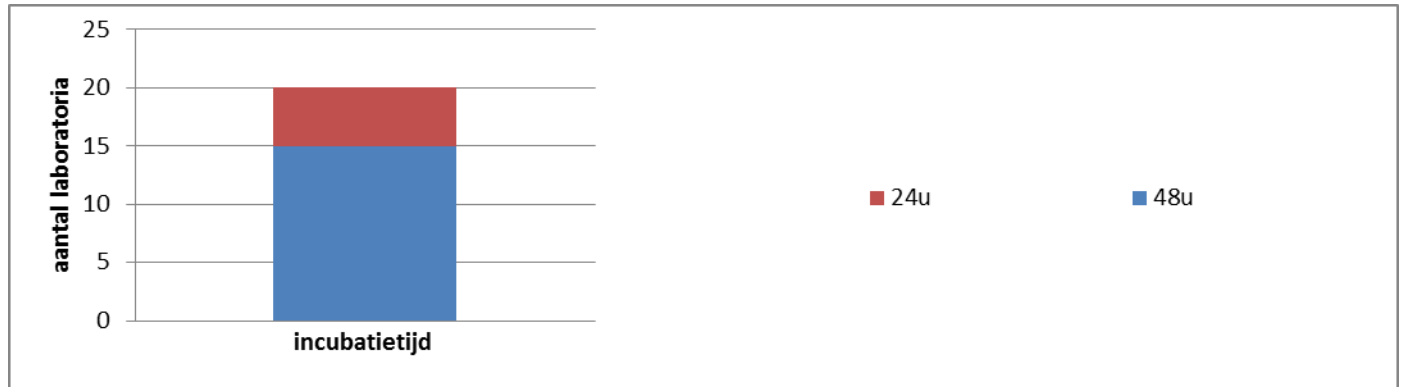
Kiem (staal)	robuust X	robuuste SD
<i>L. monocytogenes</i> (1)	3.121	0.296
<i>L. monocytogenes</i> (2)	3.051	0.306
<i>L. monocytogenes</i> (5)	3.347	0.251
CPS (2)	3.064	0.28
CPS (4)	2.972	0.17
CPS (5)	3.17	0.194
<i>E. coli</i> (2)	2.762	0.173
<i>E. coli</i> (3)	1.655	0.307
<i>E. coli</i> (4)	2.628	0.127
<i>B. cereus</i> (1)	2.26	0.302
<i>B. cereus</i> (3)	2.672	0.22
<i>B. cereus</i> (5)	2.48	0.24



## 7. Bijkomende informatie

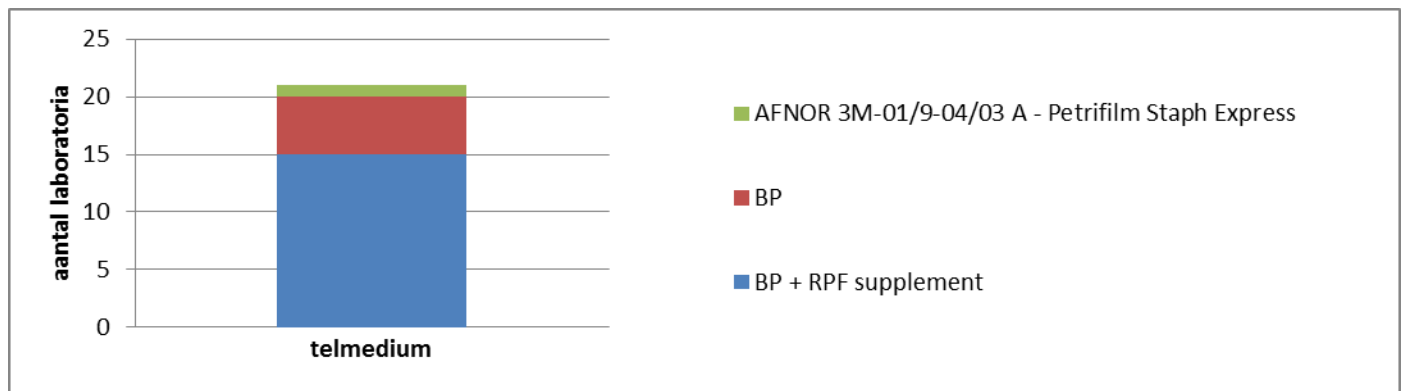
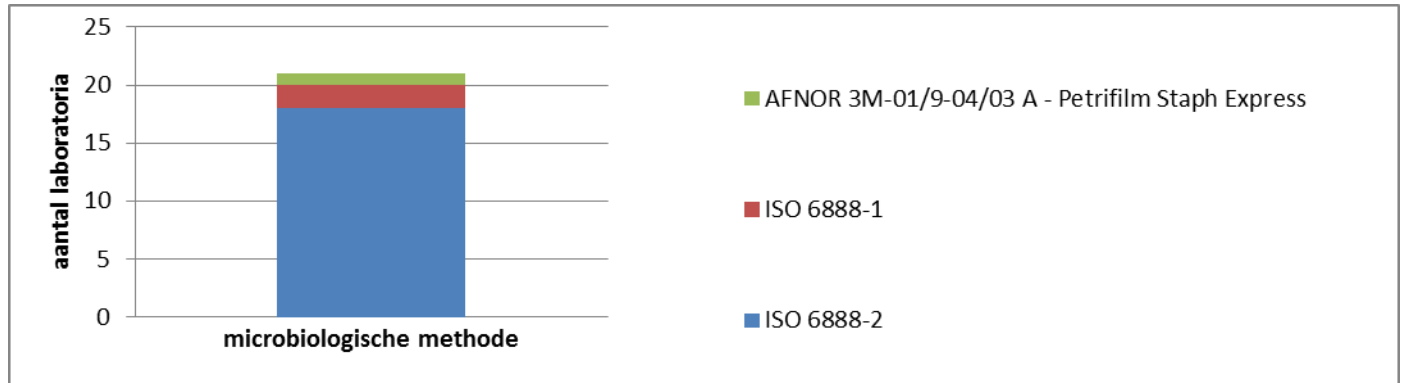
### *Bacillus cereus*

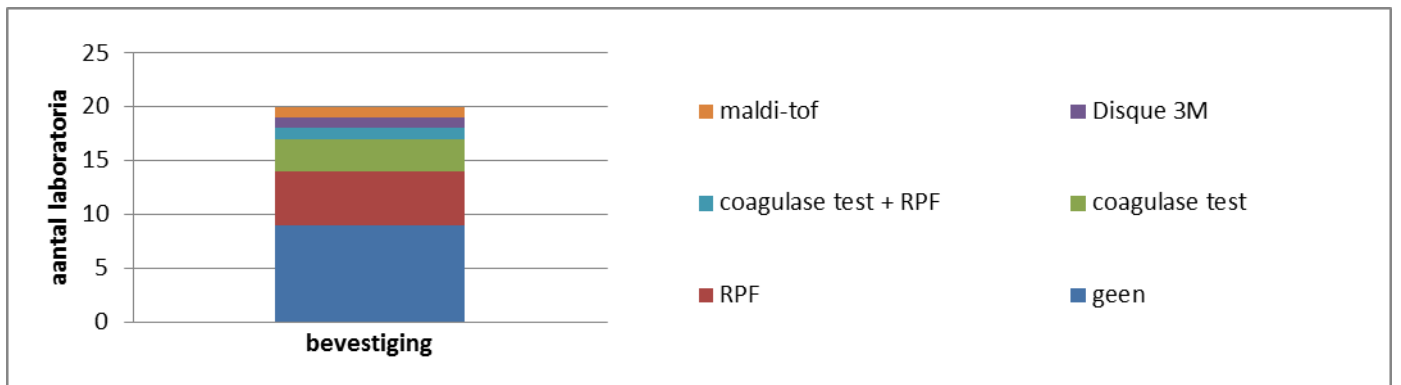
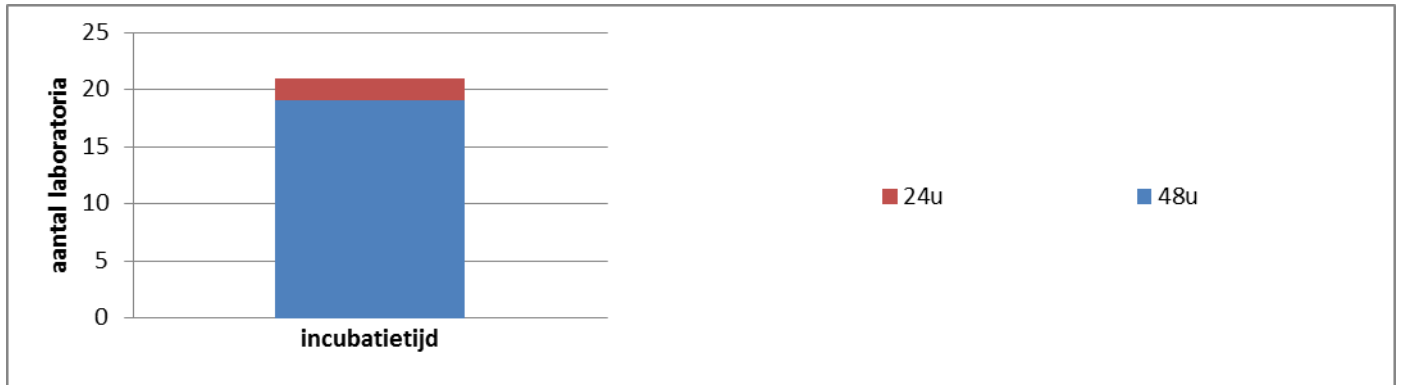






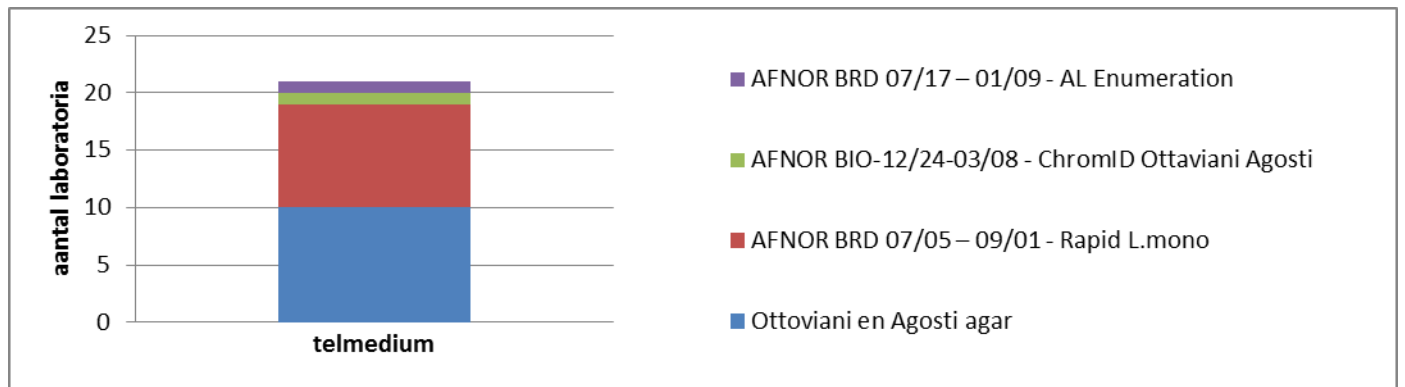
### *Staphylococcus aureus*

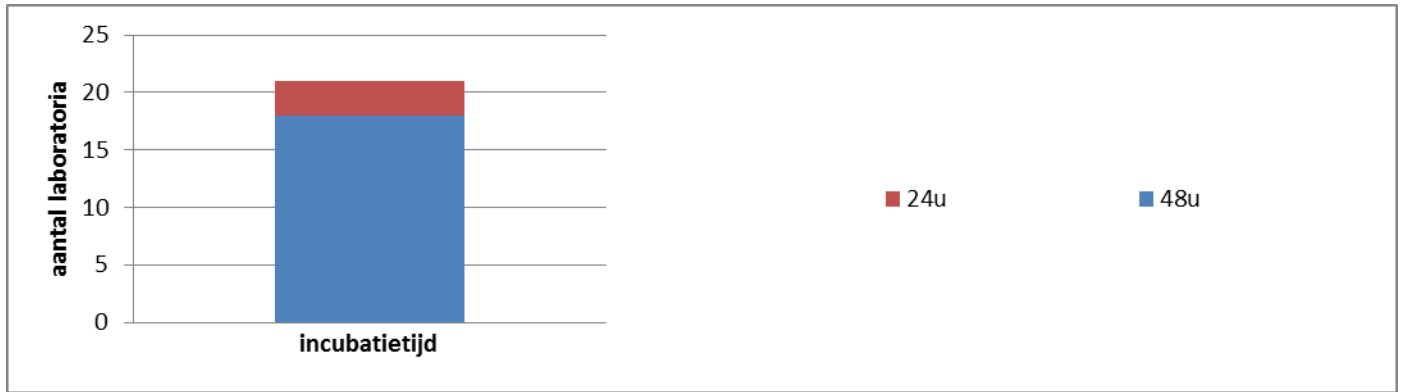


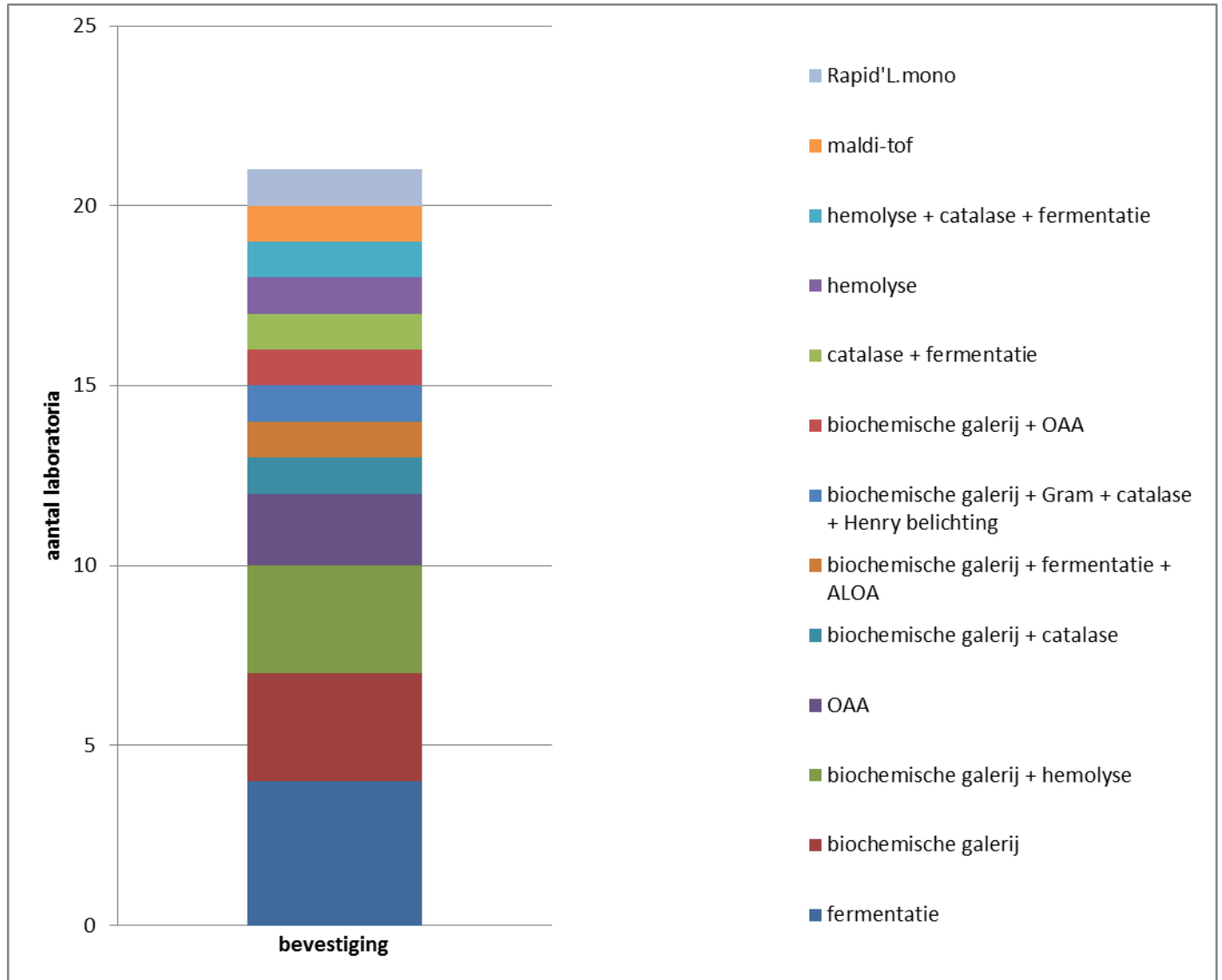




### *Listeria monocytogenes*



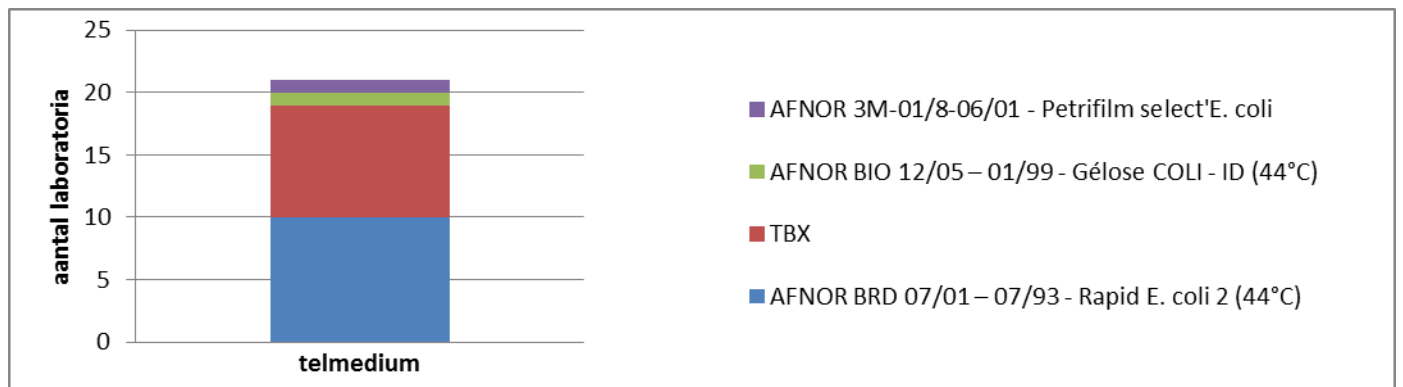
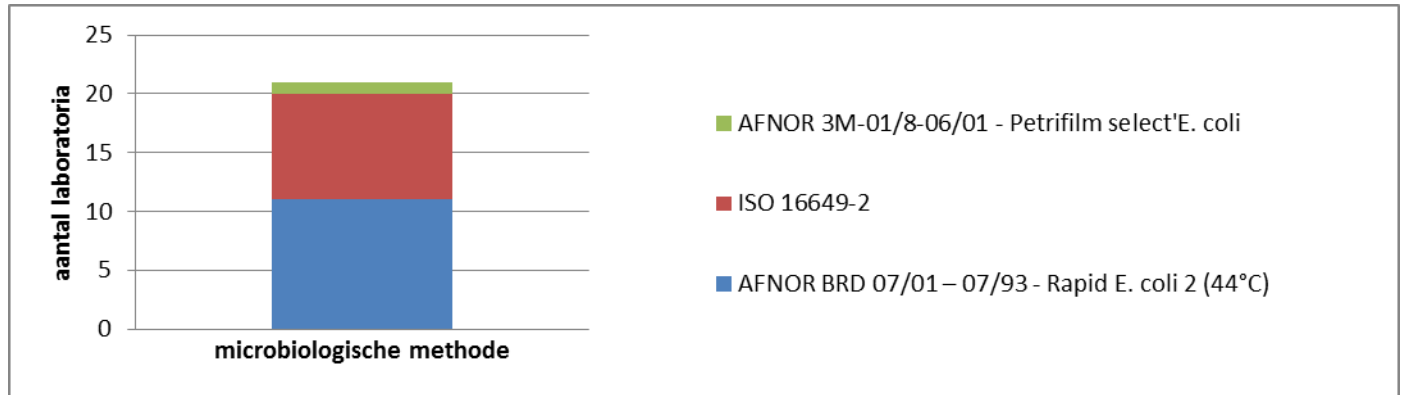


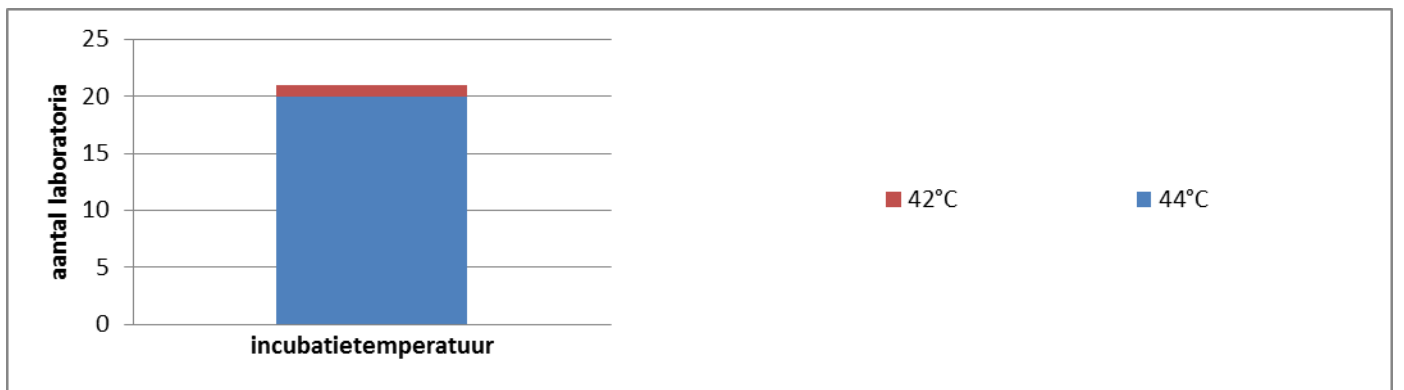






## *Escherichia coli*







## 8. Discussie en besluit

De matrix “erwten” is een matrix met een gemiddelde natuurlijke besmetting (met grootteorde  $10^3$  kve/g op de dag van de besmetting van de stalen).

Tot de resultaten met beoordeling “onvoldoende” behoren voornamelijk de vals positieve resultaten voor de telling van *L. monocytogenes*. Dit betreft vijf van de 21 laboratoria. De vals positieve resultaten vertoonden een identiek contaminatieniveau als de *L. ivanovii* die we in die stalen hadden geïnoculeerd. De bevestiging van de karakteristieke kolonies moet dus verbeterd worden in deze laboratoria want *L. ivanovii* vertoont een karakteristiek uitzicht op het tellingsmedium dat opgelegd wordt door de ISO norm 11290-2.

Het NRL merkt op dat dit type fout regelmatig voorkomt bij een paar laboratoria en zou graag de aandacht vestigen op het belang van de bevestigingstesten bij dergelijke analyses.

Het NRL merkt ook de aanwezigheid van twee vals positieve resultaten op voor *B. cereus*, wat gebeurt niet vaak.

Hierna volgen de voornaamste oorzaken van de resultaten met beoordeling “onvoldoende”:

- berekeningsfout
- kruiscontaminatie
- onvoldoende bevestigingsstappen
- slechts één verdunning op plaat
- laborant met onvoldoende ervaring
- geen specifieke oorzaak gevonden

Voor alle stalen zijn

90 % van de resultaten aanvaardbaar voor de telling van *L. monocytogenes*

100 % van de resultaten aanvaardbaar voor de telling van *E. coli*



99 % van de resultaten aanvaardbaar voor de telling van coagulase positieve *Staphylococcus*

96 % van de resultaten aanvaardbaar voor de telling van *B. cereus*

Een tussentijdsrapport met de individuele resultaten per laboratorium werd op 20 juli 2017 elektronisch verzonden. Het eindrapport werd elektronisch verzonden op 23 november 2017. Een papierenversie is beschikbaar op aanvraag.

De ringtest « telling » voor een specifieke voedingsmatrix zal opnieuw georganiseerd worden in juni 2018.