

RAPPORT FINAL

ESSAI D'APTITUDE EN MICROBIOLOGIE ALIMENTAIRE
JUN 2014

MATRICE: FROMAGE FRAIS

DENOMBREMENT

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

www.wiv-isp.be



Cette étude inter-laboratoires a porté sur l'énumération de 5 germes dans une matrice alimentaire réelle. Cette année, la matrice choisie était du fromage frais.

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

lundi 16 juin 2014	préparation et inoculation des échantillons de fromage frais
mardi 17 juin 2014	transport des colis vers les 2 dispatchings de l'AFSCA (Melle et Gembloux) par un chauffeur de l'ISP et retrait des échantillons par les laboratoires participants
mercredi 18 juin 2014	laboratoires débutent les analyses
mercredi 2 juillet 2014	date limite pour rendre les résultats à l'ISP
lundi 14 juillet 2014	rapport intermédiaire envoyé aux laboratoires par l'ISP
jeudi 30 octobre 2014	rapport final envoyé aux laboratoires par l'ISP

Chaque colis contenait :

- 4 pots (1, 2, 3, 4) contenant chacun environ 30 g de fromage frais
- un traceur de température (pour quelques laboratoires)
- un bloc réfrigérant
- les instructions



ILVO – VOEDING	Melle
SGS	Anvers
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	Bruxelles
BIOTOX	Jabbeke
LARECO	Marche-en-Famenne
EUROFINS	Brugge
BRULABO	Bruxelles
CARAH	Ath
HVS	Mons

21 laboratoires ont participé.



2. Composition des échantillons

Les échantillons ont été préparés le lundi 16 juin à partir de fromage frais acheté en grand magasin. L'inoculation artificielle a eu lieu avec les souches suivantes :

souches	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Escherichia coli</i>
référence	RM LYO 4389	témoin positif	témoin positif	RM 6151	témoin positif
source	ATCC 25923	LMG 6395	ATCC 14579	/	ATCC 25922

Certaines souches ont été fournies par le service « Qualité des laboratoires médicaux».

Contamination artificielle des 4 échantillons :

Chaque échantillon a été contaminé à une concentration de x log cfu/g/germe, afin de mimer des contaminations faibles et moyennes.

Certains échantillons n'ont pas été contaminés pour certains paramètres = blancs.

Tableau 1 : Aperçu de la contamination des échantillons 1-4 avec les 5 germes sélectionnés (concentration en 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	/

Après contamination, les échantillons ont été conservés au frigo pendant une nuit avant leur envoi.



3. Procédure d'analyse

Pour les 4 échantillons, 5 paramètres étaient à analyser. La procédure était identique pour chaque échantillon, à savoir :

- . Sous-échantillonner 10g du pot et préparer la suspension mère (SM) à partir de ceux-ci
- . Pour la suite, procéder de la même manière que lors des analyses de routine
- . Dénombrer : *Pseudomonas spp*, *L. monocytogenes*, *Staphylococcus* Coagulase positive (CPS), *B. cereus*, *E. coli*

Tous les laboratoires ont effectué le dénombrement de *Staphylococcus* Coagulase +, *L. monocytogenes*, *E. coli*.

2 laboratoires n'ont pas effectué le dénombrement de *B. cereus*.

8 laboratoires n'ont pas effectué le dénombrement de *Pseudomonas spp*.

4. Tests d'homogénéité et de stabilité

Les échantillons ont été préparés le lundi 16 juin et un test d'homogénéité a été réalisé le jour-même sur 5 pots de chaque type d'échantillon pour chaque paramètre. Tous les paramètres étaient homogènes (voir coefficient de variation dans le tableau ci-dessous).

Les tests de stabilité ont été réalisés le mercredi 18 juin sur les 5 types d'échantillons, en triple. Les valeurs étaient stables (voir valeurs moyennes de stabilité dans le tableau ci-dessous), excepté pour *B. cereus* qui n'est pas stable dans les échantillons 2 et 4 et se trouvait sous la limite de détection (< 10 ufc/g). Les échantillons 1, 3 et 4 contaminés avec *S. aureus* n'étaient pas stables non plus, avec une diminution d'un facteur 1,5 – 2 log ufc/g. Malgré la non-stabilité des échantillons pour ces 2 paramètres, les échantillons étaient toutefois toujours contaminés de manière homogène (voir CV stabilité *S. aureus* ci-dessous). Malgré nos nombreux tests



Rapport final essai d'aptitude dénombrement 2014 | LNR Microbiologie alimentaire |
 préliminaires, nous n'avons pu maintenir *B. cereus* stable durant 2 jours dans cette
 matrice. Le fromage frais est une matrice acide (ph = 4.48), ce qui peut peut-être
 expliquer pourquoi ces deux bactéries ne sont pas restées stables.

		Homogénéité		Stabilité	
		16/06/2014		18/06/2014	
		Valeurs moyennes en log ufc/g	CV	Valeurs moyennes en log ufc/g	CV
1	<i>Bacillus cereus</i>	absent	/	absent	/
	<i>Staphylococcus aureus</i>	3.57 ± 0.12	0.03	non déterminé	/
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	absent	/	absent	/
	<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	/
2	<i>Bacillus cereus</i>	3.33 ± 0.07	0.02	< 10 ufc/g	/
	<i>Staphylococcus aureus</i>	absent	/	absent	/
	<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	/
3	<i>Bacillus cereus</i>	absent	/	absent	/
	<i>Staphylococcus aureus</i>	3.73 ± 0.06	0.02	non déterminé	/
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.99 ± 0.29	0.10	2.32 ± 0.27	0.12
	<i>Listeria monocytogenes</i>	absent	/	absent	/
	<i>Escherichia coli</i>	1.81 ± 0.17	0.09	1.69 ± 0.21	/
4	<i>Bacillus cereus</i>	4.09 ± 0.12	0.03	< 10 ufc/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>	absent	/	absent	/

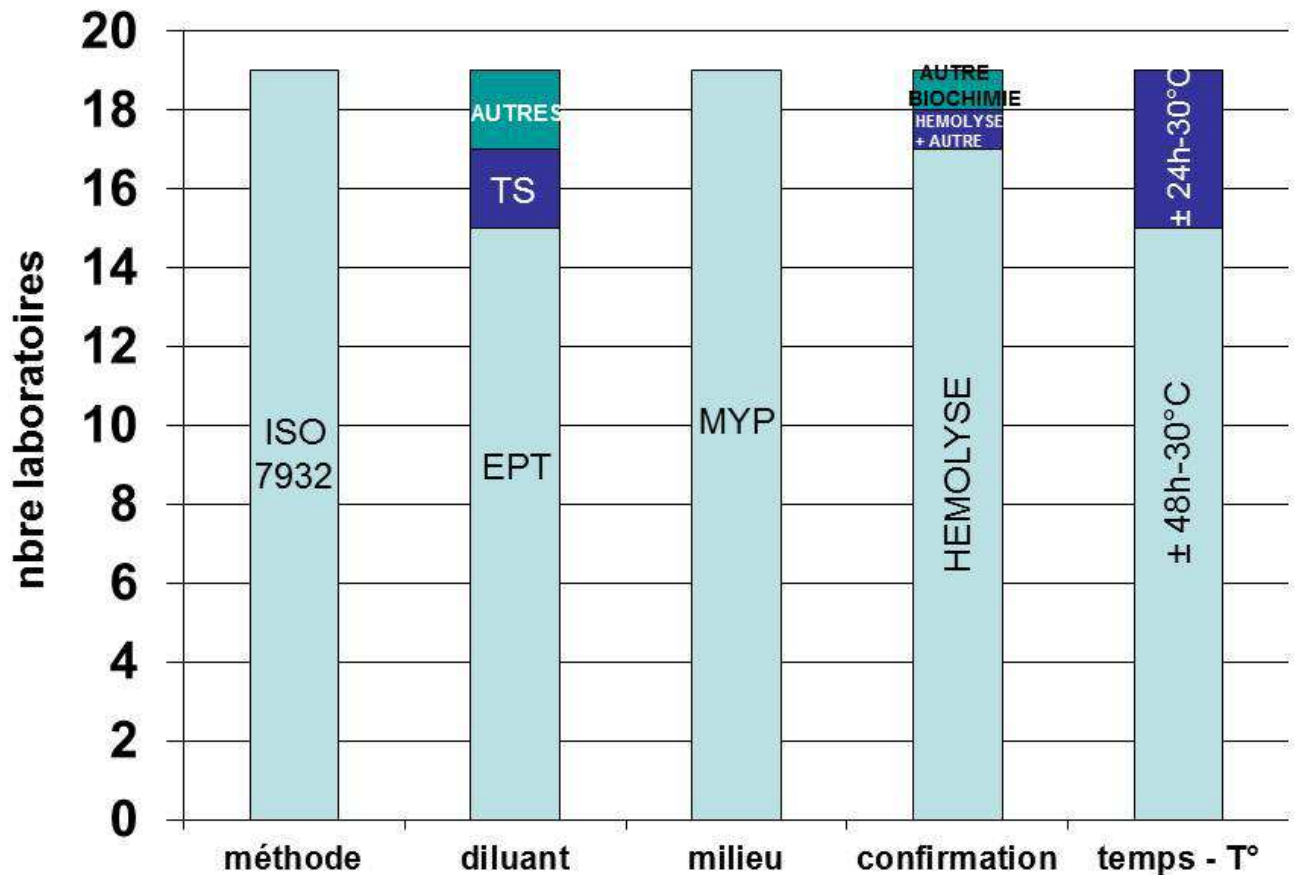
CV = coefficient de variation = écart-type/moyenne

Critères d'acceptation homogénéité: CV < 15%

Critères d'acceptation stabilité : homogénéité ± 25%

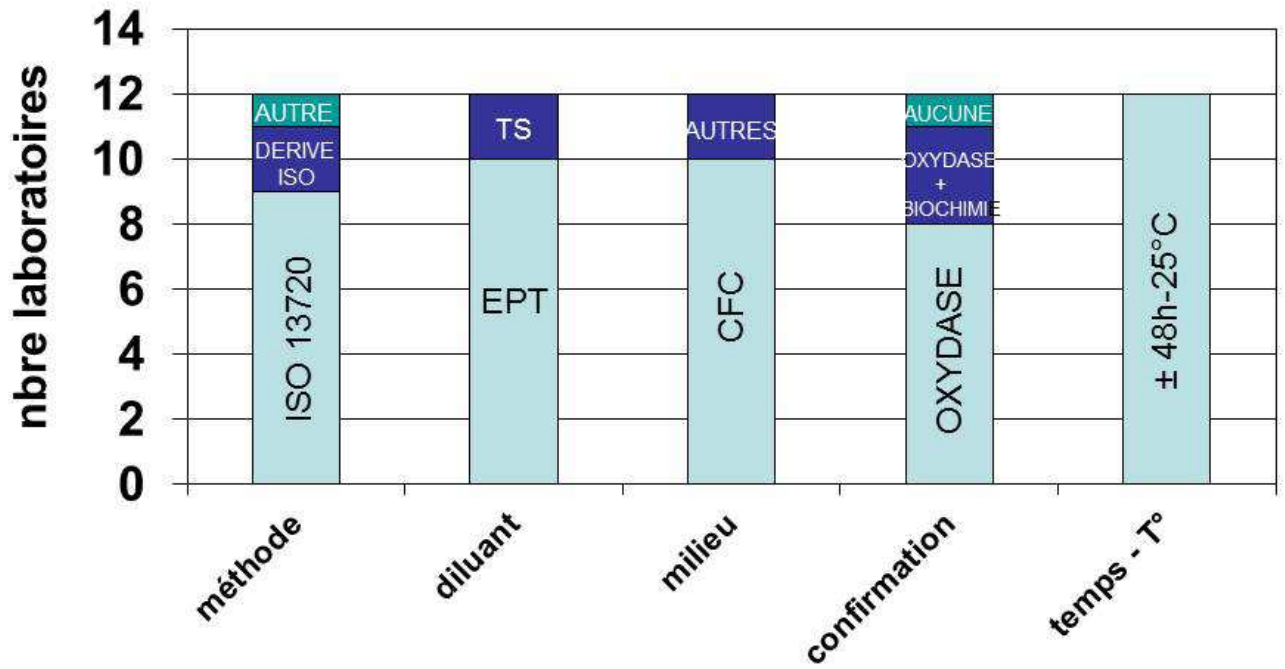
5. Compte-rendu des analyses

Bacillus cereus



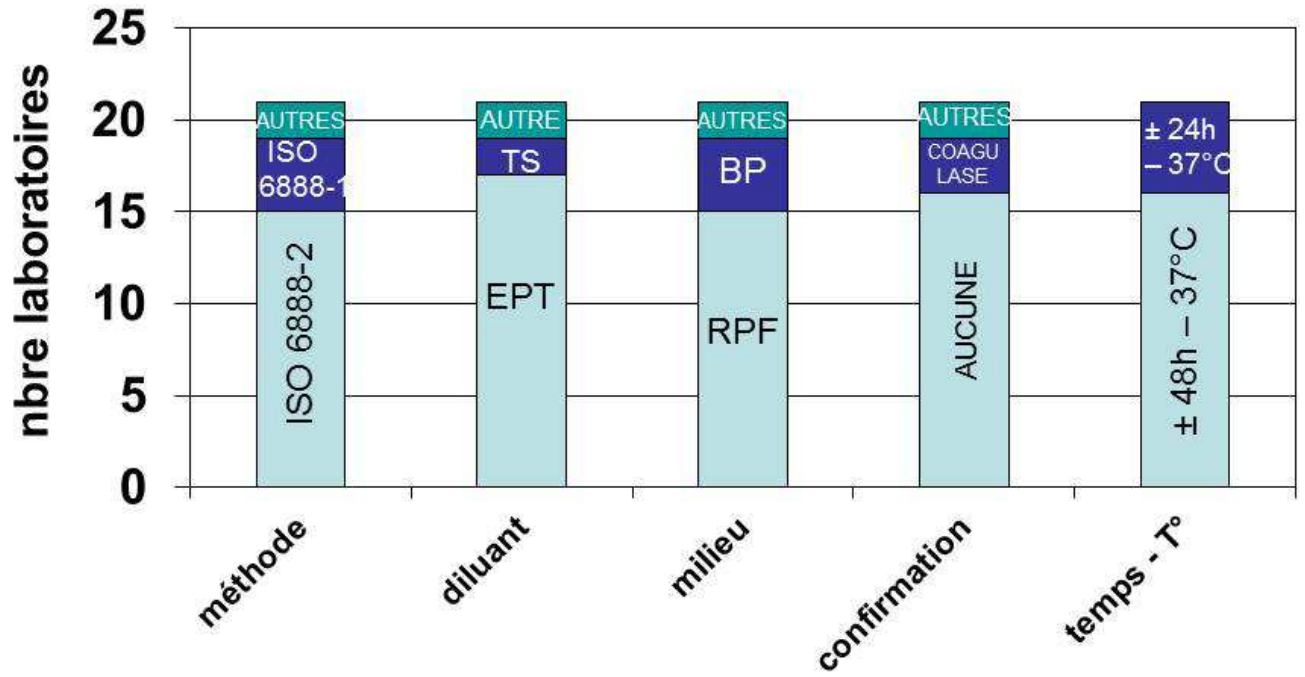


Pseudomonas spp.



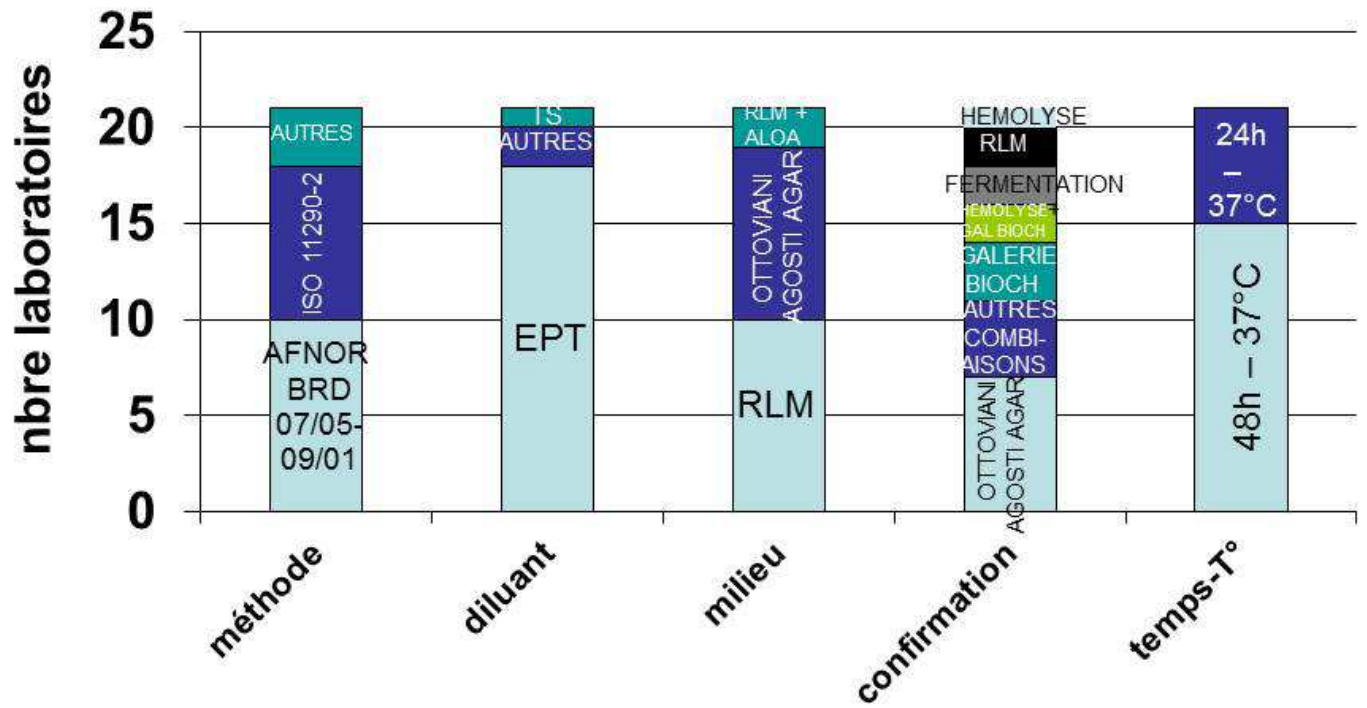


Staphylococcus aureus



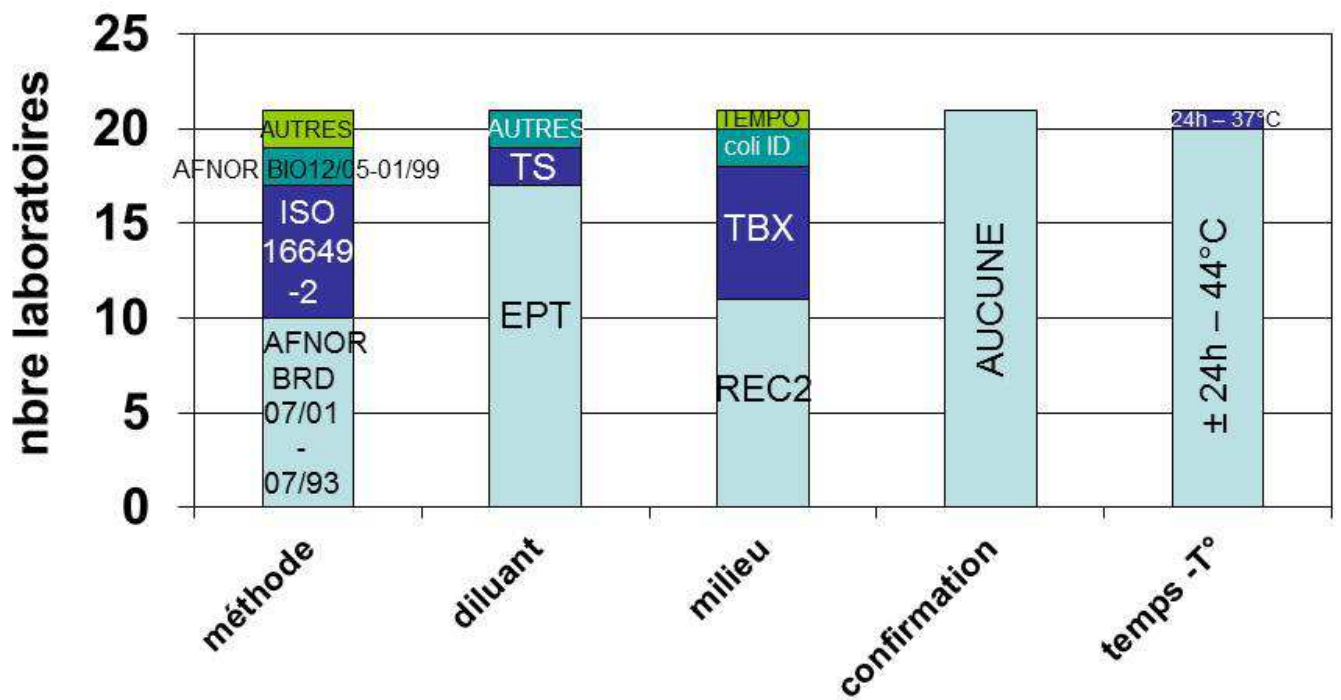


Listeria monocytogenes





Escherichia coli





6. Performance des laboratoires : z-scores

L'analyse statistique a été réalisée par le service « Qualité des laboratoires médicaux ».

Le z-score par paramètre est calculé à l'aide de la moyenne robuste et de l'écart-type robuste des résultats de tous les participants.

Les résultats « < ... ufc/g » ne sont pas pris en compte dans le calcul de la moyenne robuste. Cependant, un z-score est calculé avec la valeur absolue du résultat afin de vérifier la performance du laboratoire. Ce z-score n'est pas transmis au laboratoire si le résultat est correct.

Tableau récapitulatif des z-scores des laboratoires

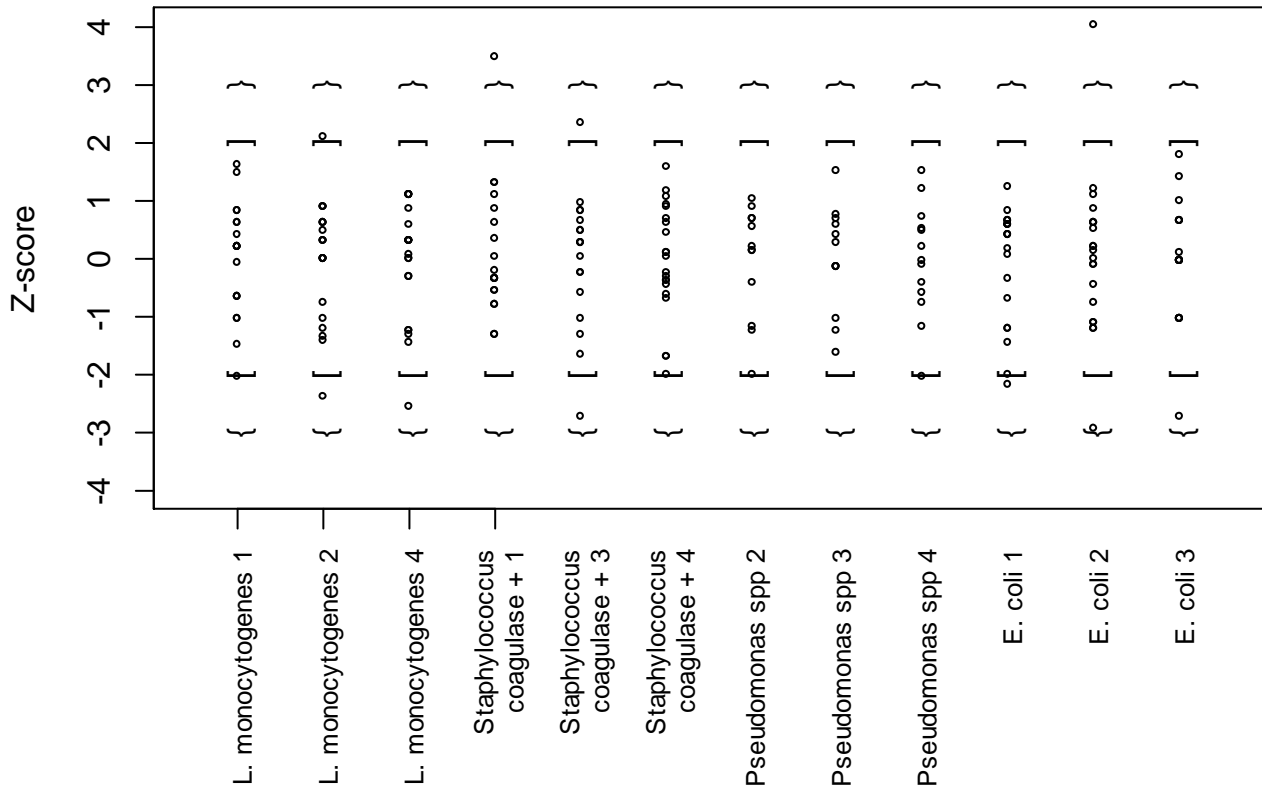
CPS = *Staphylococcus coagulase positive*

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	résultat "<..."	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	résultat "<..."	-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	résultat "<..."		-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 entre 2 et 3 ou entre -2 et -3
 Z-score > 3 ou < -3
 analyse non réalisée
 pas de z-score calculé



Graphique des z-scores des laboratoires



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

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

Faux-positifs, faux-négatifs

le laboratoire 10 a rapporté un résultat faux-négatif pour *Pseudomonas* spp. - échantillons 2 et 3



7. Moyenne robuste (X) et écart-type robuste (SD)

Germe (échantillon)	X robuste	SD robuste
<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

Voici à titre indicatif un tableau comparatif des écarts-types robustes (SD robustes) de l'essai de juin 2014 avec les écarts-types robustes calculés lors des EIL RAEMA 38 et 44 et lors des essais de juin 2012 et 2013 de l'ISP.

	moyenne SD robustes ISP juin 2014	moyenne SD robustes ISP juin 2012	moyenne SD robustes ISP juin 2013	moyenne SD robustes RAEMA 38	moyenne SD robustes 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. Discussion et conclusions

La matrice « fromage frais » est une matrice qui ne permet pas ou peu la survie des germes comme *B. cereus* et *Staphylococcus aureus*. Cela peut peut-être être imputé au pH faible de cette matrice.



Tous les échantillons confondus,

92 % des résultats étaient satisfaisants pour le dénombrement de *L. monocytogenes*

92 % des résultats étaient satisfaisants pour le dénombrement de *E. coli*

92 % des résultats étaient satisfaisants pour le dénombrement de *Pseudomonas spp.*

92 % des résultats étaient satisfaisants pour le dénombrement de *Staphylococcus*
coagulase positive

Un rapport intermédiaire a été envoyé à chaque laboratoire en version électronique le 14 juillet 2014. Le rapport final est envoyé le 30 octobre 2014 en version électronique. Une version papier est disponible sur demande.

Le prochain essai d'aptitude « dénombrement » sur une matrice différente sera organisé en juin 2015.