

RAPPORT FINAL

ESSAI D'APTITUDE EN MICROBIOLOGIE ALIMENTAIRE JUN 2017

PT – 2 DENOMBREMENT DANS LES LEGUMES

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 : Marie Polet
Responsable scientifique : Marie Polet
Responsable technique : Astrid Huwaert
Approbation scientifique : Nadine Botteldoorn
Rue J. Wytsman 14
1050 Bruxelles | Belgique



Cet essai d'aptitude porte sur l'énumération de quatre germes dans une matrice alimentaire naturellement contaminée en flore mésophile. Cette année, la matrice « petits pois » a été choisie.

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

1. Déroulement de l'étude

lundi 12 juin 2017	préparation et inoculation des échantillons
mardi 13 juin 2017	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 14 juin 2017	les laboratoires débutent les analyses
lundi 26 juin 2017	date limite pour rendre les résultats à l'ISP
jeudi 20 juillet 2017	rapport intermédiaire envoyé aux laboratoires par l'ISP
jeudi 23 novembre 2017	rapport final envoyé aux laboratoires par l'ISP

Chaque colis contenait :

- cinq pots (1, 2, 3, 4 et 5) contenant chacun environ 20 g de petits pois
- un traceur de température (pour la moitié des laboratoires)
- un bloc réfrigérant
- les instructions



Laboratoires participants :

ILVO – T&V	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 petits pois ont été achetés congelés en grand magasin (lots différents). Le jour de la préparation des échantillons, les petits pois ont été décongelés deux heures à température ambiante et ensuite contaminés avec plusieurs bactéries. L'inoculation artificielle a eu lieu avec les souches suivantes:

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

Ces souches proviennent de la collection de l'ISP.

Contamination artificielle des cinq échantillons :

Les échantillons ont été contaminés de manière à mimer des contaminations faible et moyenne. La quantité de bactéries dans l'inoculum a été déterminée par un dénombrement en triple sur un milieu non-sélectif.

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

Echantillon 1 : contaminé avec *B. cereus* et *L. monocytogenes*

Echantillon 2 : contaminé avec *E. coli*, *S. aureus* et *L. monocytogenes*

Echantillon 3 : contaminé avec *E. coli*, *B. cereus* et *L. ivanovii* (10³ cfu/g)

Echantillon 4 : contaminé avec *E. coli*, *S. aureus* et *L. ivanovii* (10³ cfu/g)

Echantillon 5 : contaminé avec *S. aureus*, *B. cereus* et *L. monocytogenes*

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



3. Procédure d'analyse

Pour les cinq échantillons, quatre paramètres sont à analyser. La procédure est 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
- . Dénommer : *L. monocytogenes*, *Staphylococcus* coagulase positive (CPS), *B. cereus*, *E. coli*

Tous les laboratoires ont effectué le dénombrement de CPS, *L. monocytogenes*, *E. coli*.

1 laboratoire n'a pas effectué le dénombrement de *B. cereus*.

4. Analyses associées

➤ Tests d'homogénéité et de stabilité

Un test d'homogénéité a été réalisé préalablement à l'essai d'aptitude, afin de valider la technique de contamination. Ce test a été effectué sur cinq échantillons de chacun des cinq lots pour chaque germe inoculé, deux jours après la préparation des échantillons (le matin). Les échantillons étaient homogènes.

Les échantillons ont été préparés le lundi 12 juin et le niveau de contamination a été déterminé le jour-même sur un échantillon de chaque lot pour chaque germe. Un test d'homogénéité a été réalisé le mercredi 14 juin (J+2) sur cinq échantillons de chaque lot pour chaque germe inoculé. Les échantillons étaient homogènes. Un test a été effectué le même jour pour vérifier la stabilité entre la matinée et l'après-midi. Les échantillons étaient stables.



➤ Vérification de la contamination naturelle des échantillons

Avant l'inoculation, une analyse de dénombrement a été effectuée sur un échantillon par lot (1, 2, 3, 4, et 5) pour tous les germes ainsi que pour la flore totale. Tous les résultats étaient inférieurs à la limite de détection pour les paramètres de l'essai d'aptitude. De plus, lors du test d'homogénéité à J+2, pour chaque lot, un dénombrement a été réalisé pour les germes non inoculés. Les résultats étaient inférieurs à la limite de détection.

5. 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.



Tableau récapitulatif des z-scores des laboratoires

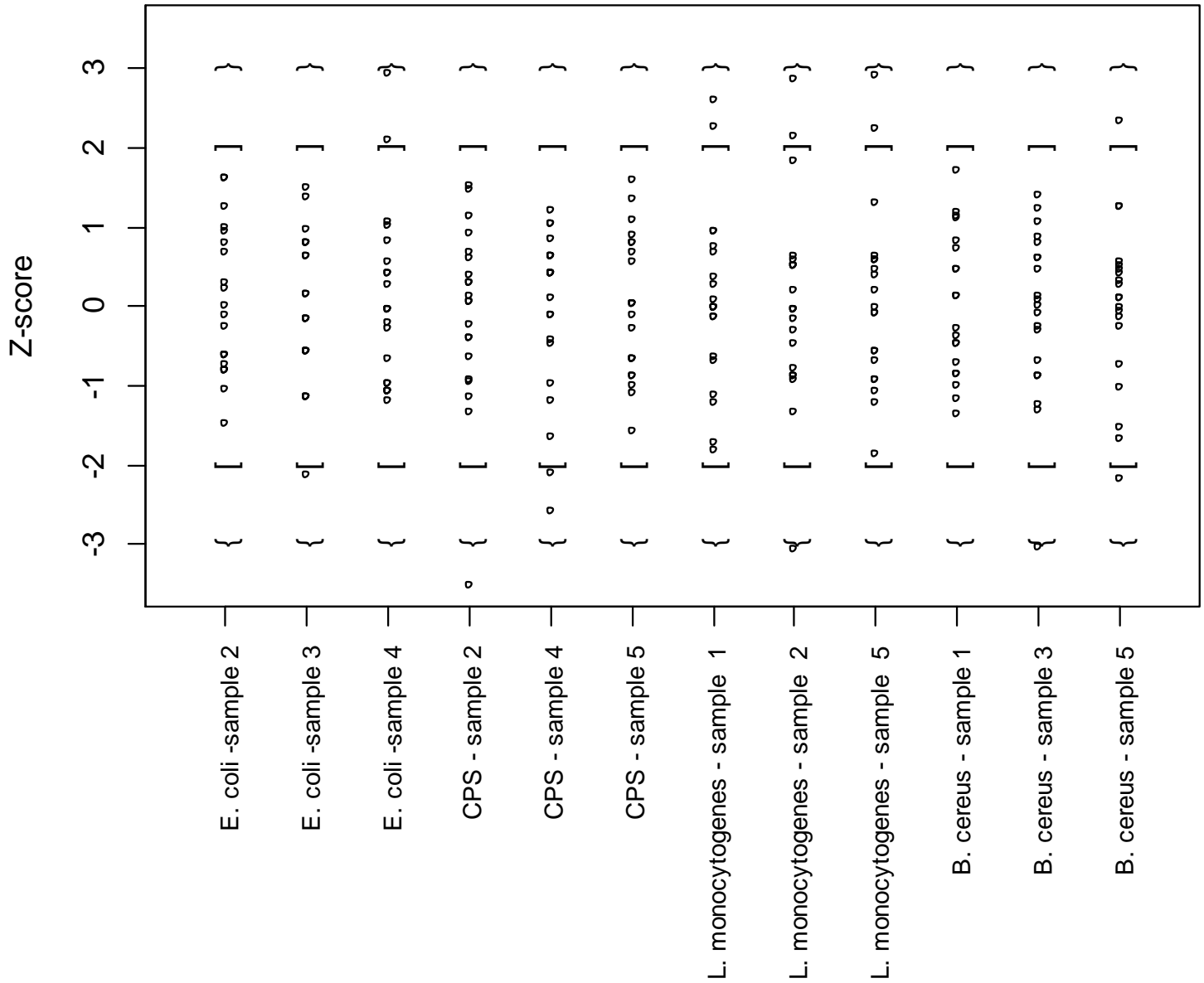
CPS = *Staphylococcus coagulase positive*

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 entre 2 et 3 ou entre -2 et -3
 Z-score > 3 ou < -3
 analyse non réalisée



Graphique des z-scores des laboratoires



[] limites z-scores (+2 ; -2)
 { } limites z-scores (+3 ; -3)



Faux-positifs, faux-négatifs

Les laboratoires 6, 10, 15, 16 et 18 ont rapporté un résultat faux-positif pour *L. monocytogenes* – échantillons 3 et 4.

Le laboratoire 6 a rapporté un résultat faux-positif pour *B. cereus* – échantillons 2 et 4.

Le laboratoire 10 a rapporté un résultat faux-positif pour *B. cereus* – échantillon 2.

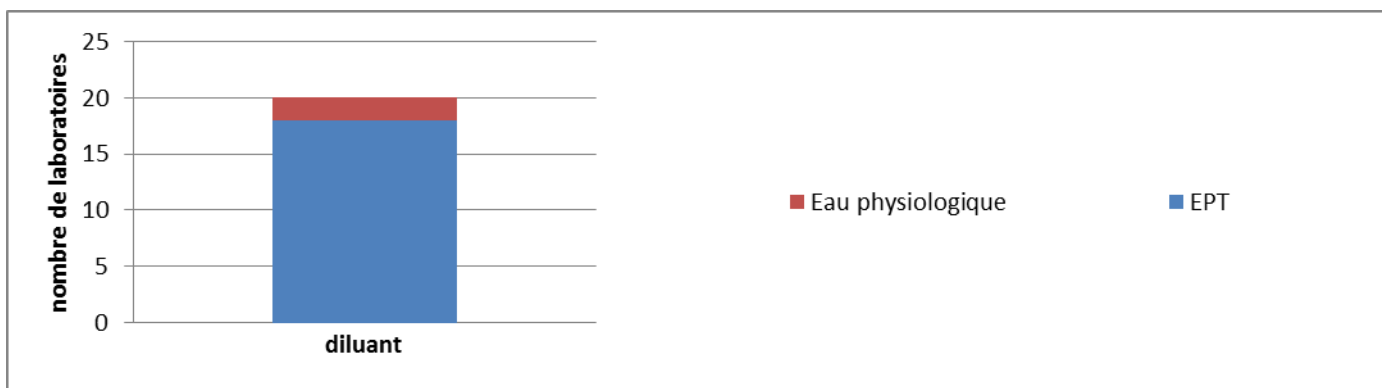
6. Moyenne robuste (X) et écart-type robuste (SD)

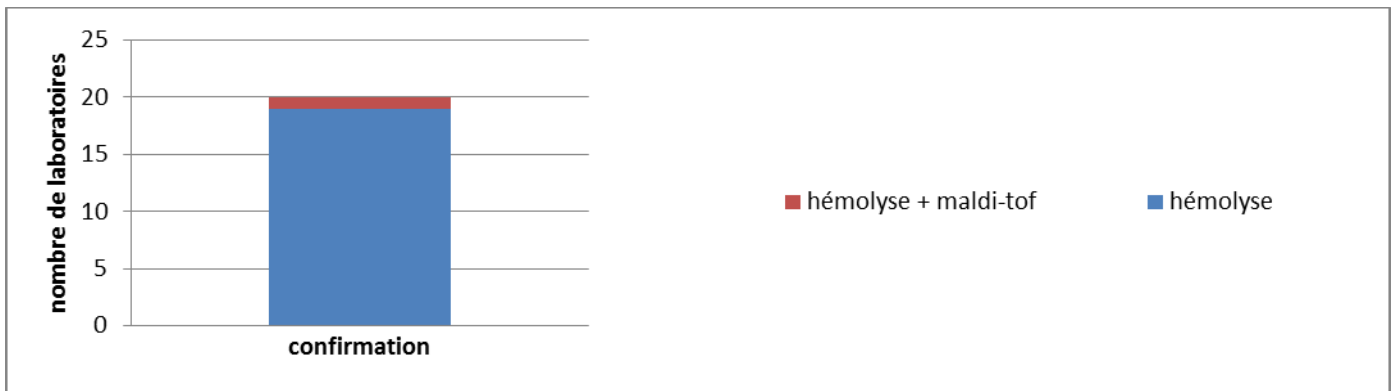
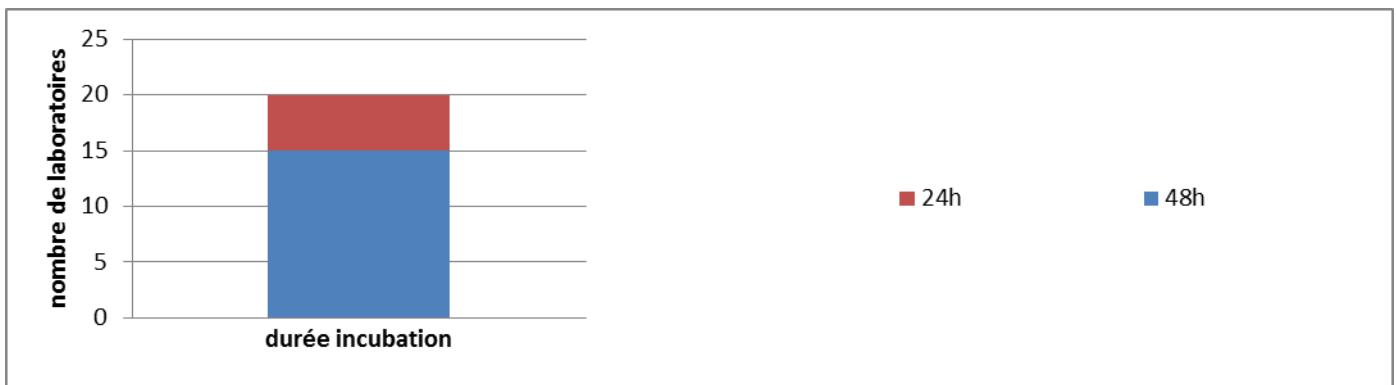
Germe (échantillon)	X robuste	SD robuste
<i>L. monocytogenes</i> (1)	3.121	0.296
<i>L. monocytogenes</i> (2)	3.051	0.306
<i>L. monocytogenes</i> (5)	3.347	0.251
CPS (2)	3.064	0.28
CPS (4)	2.972	0.17
CPS (5)	3.17	0.194
<i>E. coli</i> (2)	2.762	0.173
<i>E. coli</i> (3)	1.655	0.307
<i>E. coli</i> (4)	2.628	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. Informations complémentaires

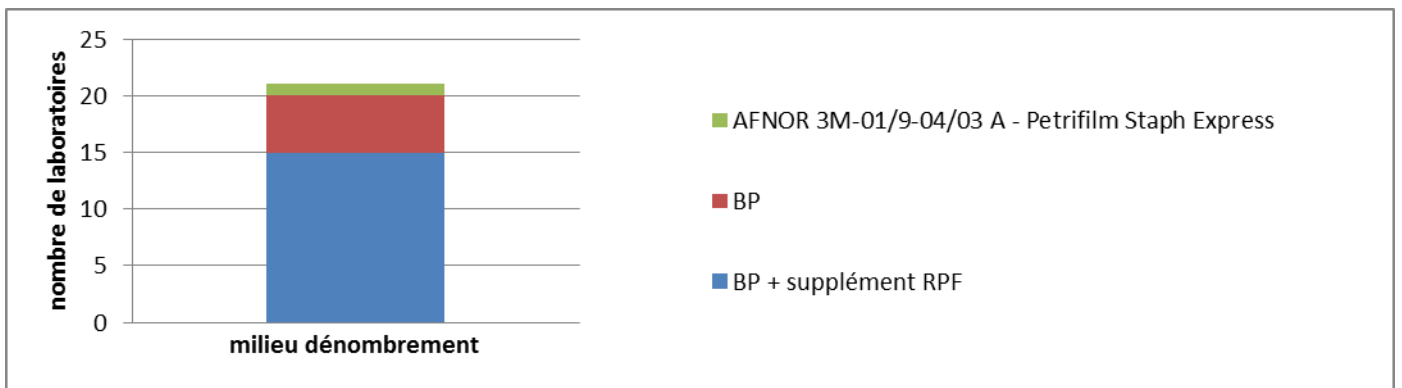
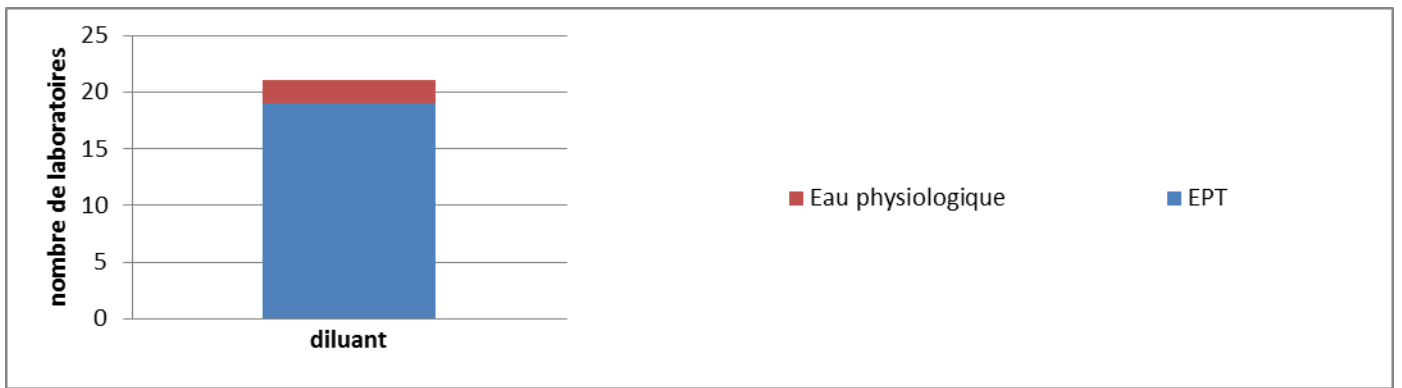
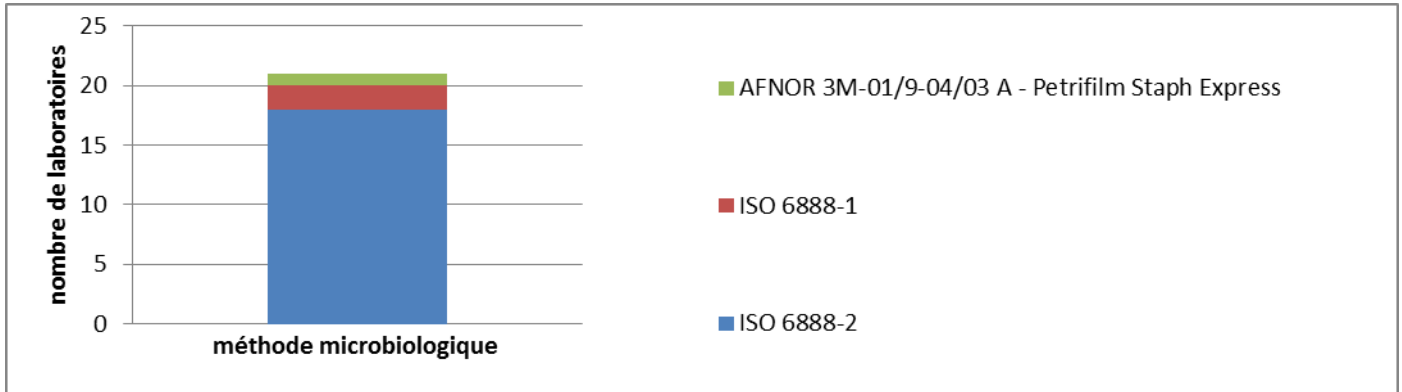
Bacillus cereus

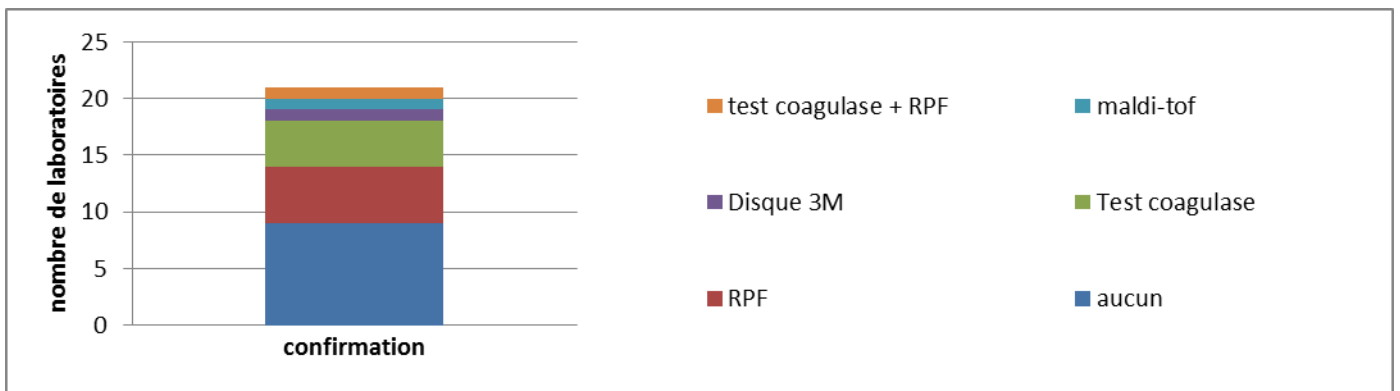
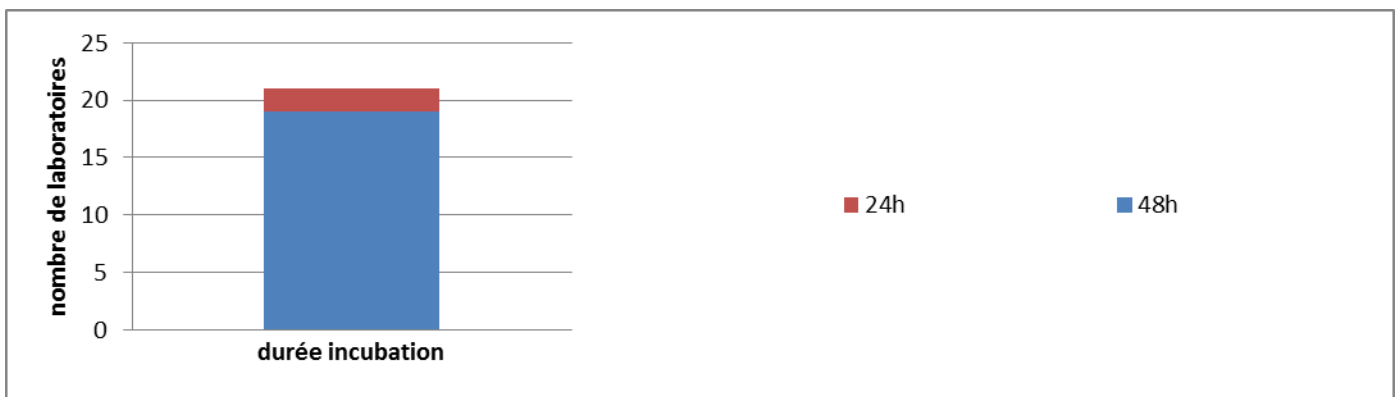






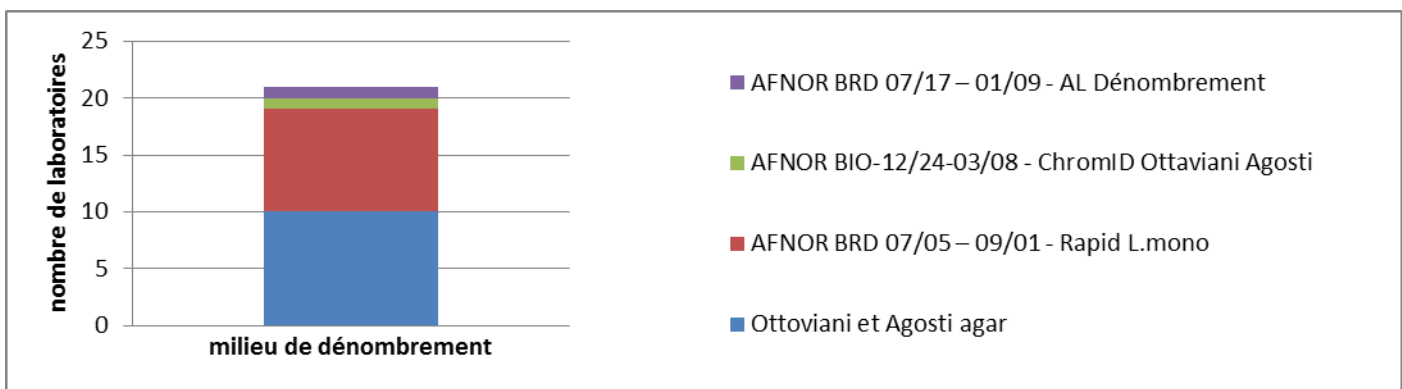
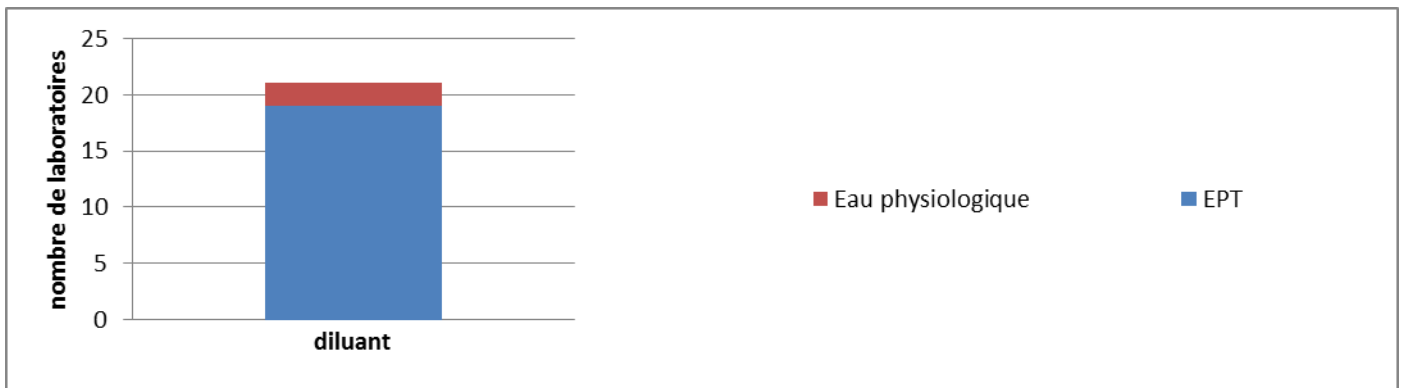
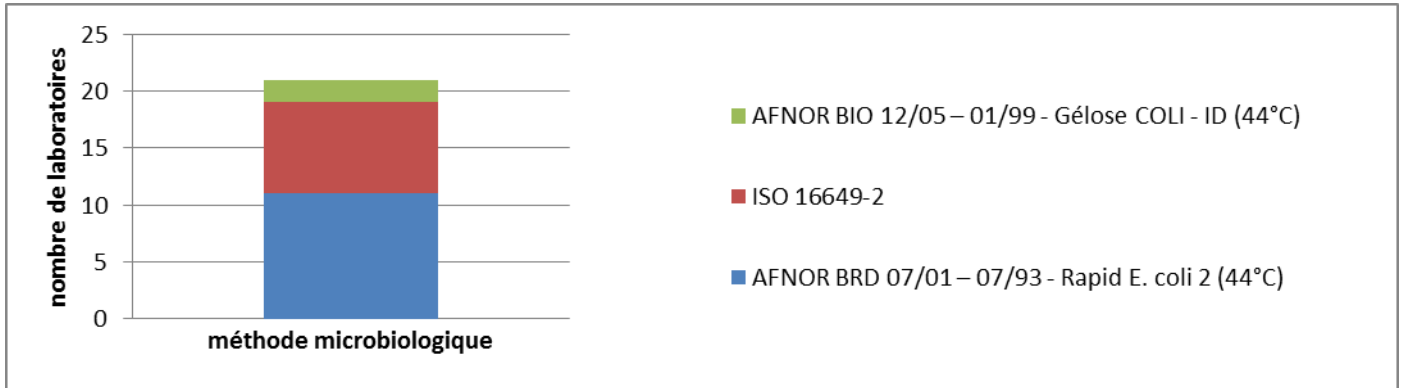
Staphylococcus aureus

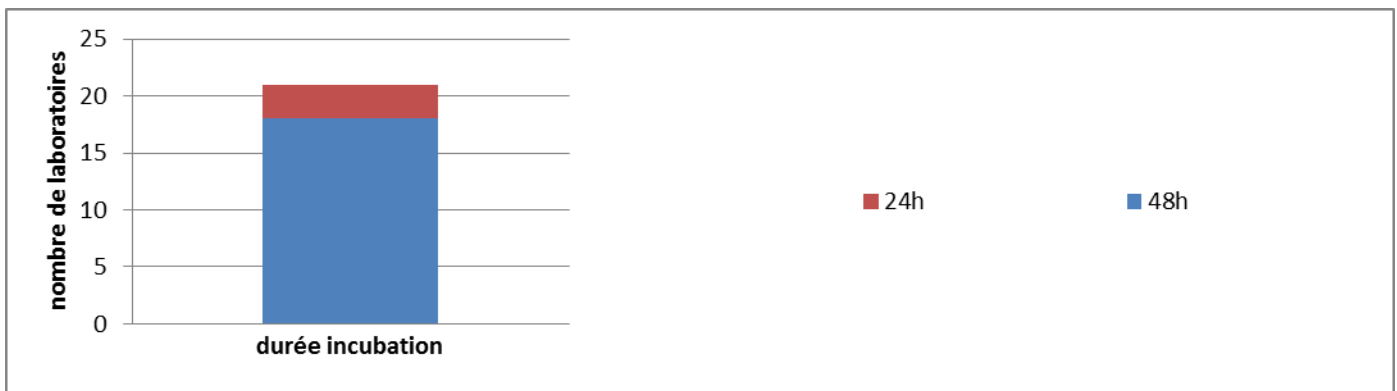


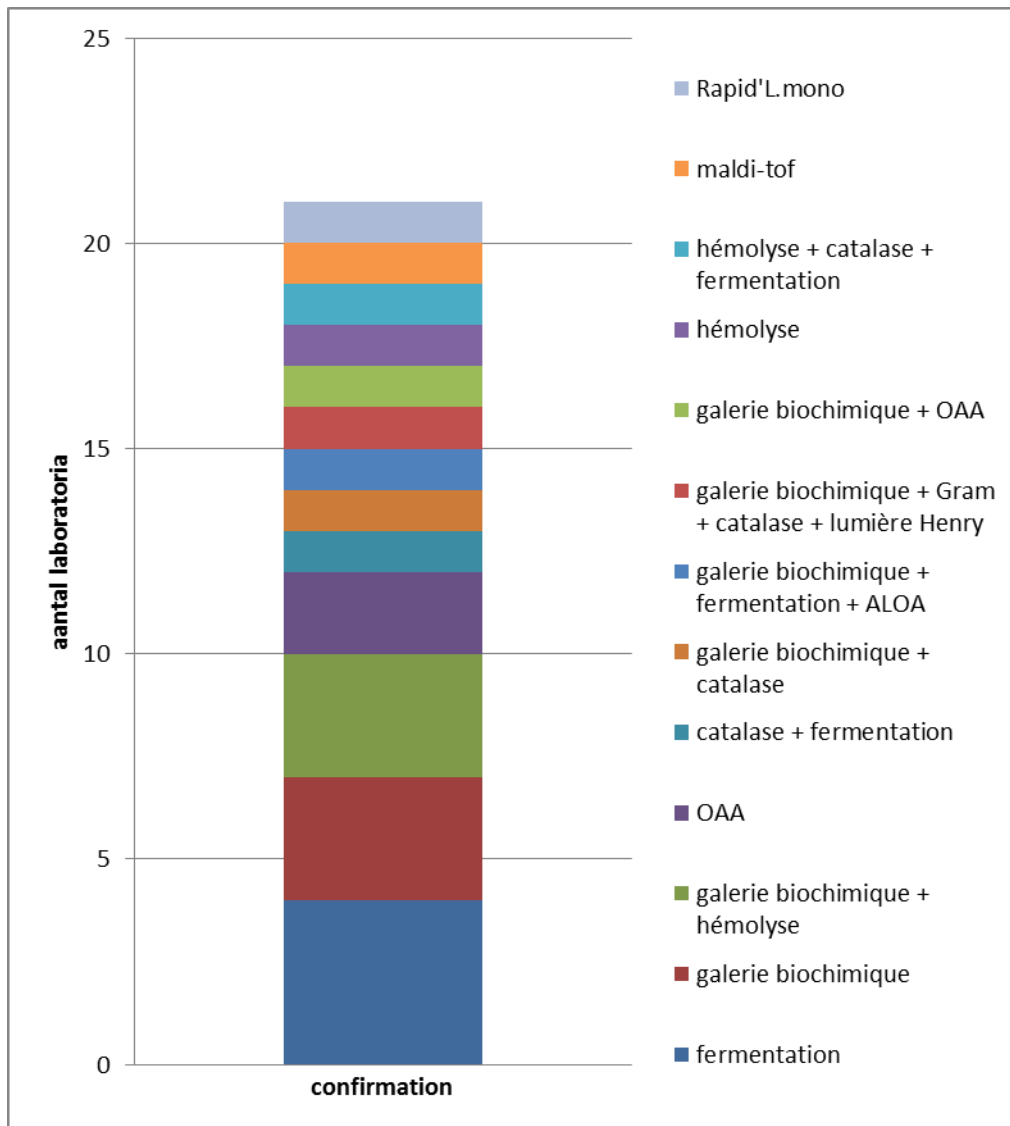




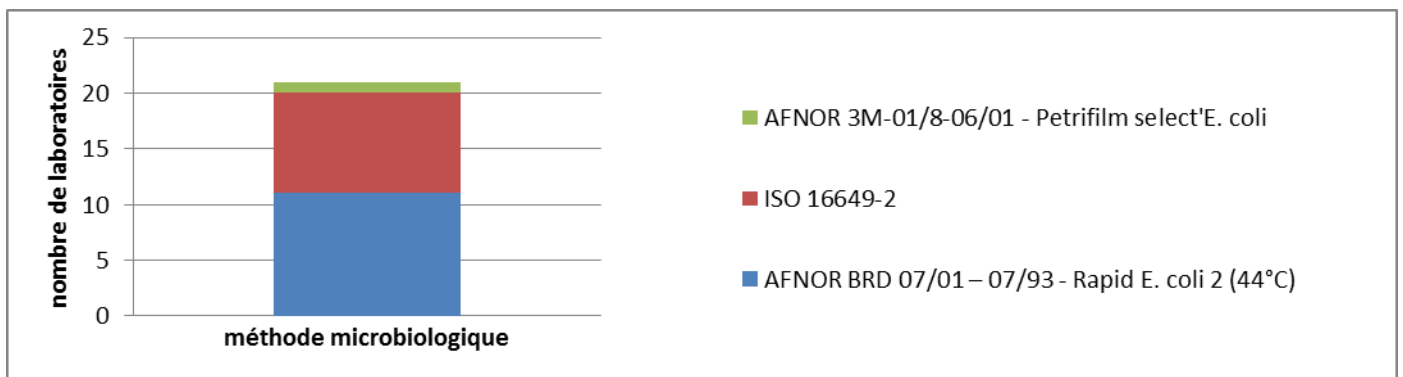
Listeria monocytogenes

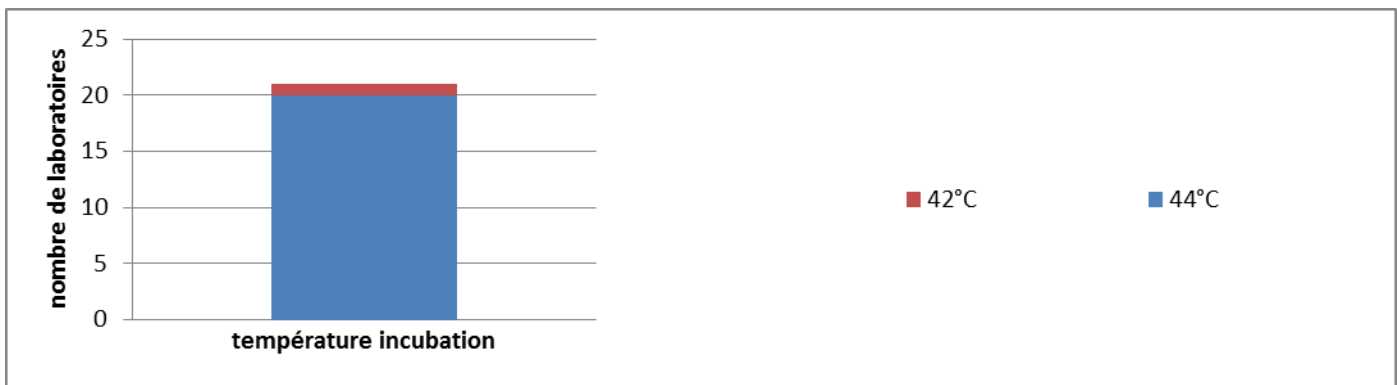
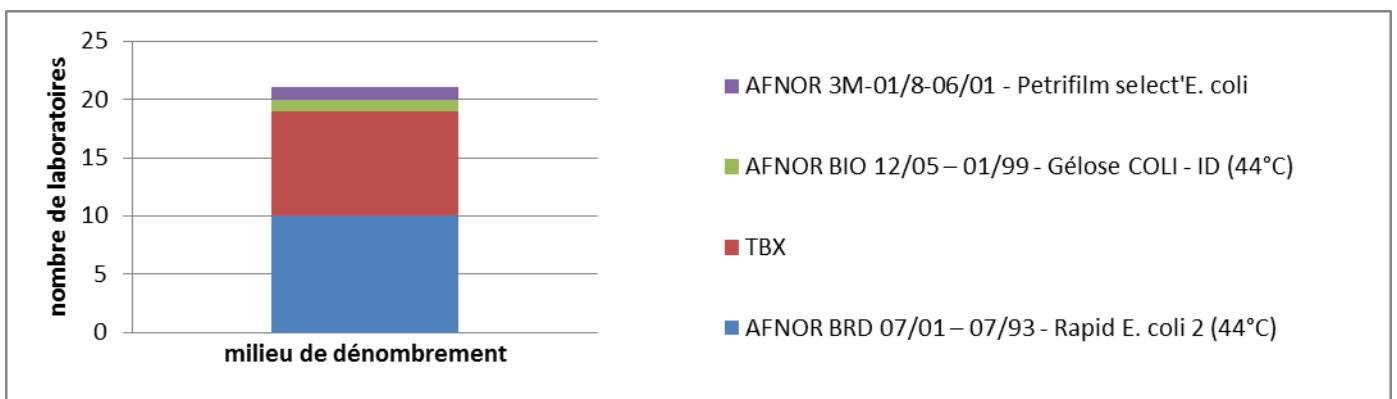






Escherichia coli







8. Discussion et conclusions

La matrice « petit pois » est une matrice moyennement contaminée naturellement (de l'ordre de 10^3 ufc/g le jour de la contamination des échantillons).

Les résultats insatisfaisants sont principalement dus aux résultats faux-positifs pour le dénombrement de *L. monocytogenes*, échantillons 3 et 4. En effet, cinq laboratoires sur 21 sont concernés. Ces résultats faux-positifs ont des niveaux identiques à ceux de *L. ivanovii* que nous avons inoculé dans ces mêmes échantillons. La confirmation des colonies caractéristiques doit donc être améliorée dans ces laboratoires car *L. ivanovii* apparaît caractéristique sur le milieu de dénombrement préconisé par la norme ISO 11290-2.

Le LNR remarque que ce type d'erreur est récurrent chez certains laboratoires, et met un point d'attention sur l'importance de la confirmation pour cette analyse.



Le LNR note aussi la présence de deux résultats faux-positifs pour *B. cereus*, ce qui est peu fréquent.

Les principales causes des résultats insatisfaisants sont :

- erreur de calcul
- étape de confirmation insuffisante voire nulle
- contamination croisée
- uniquement une dilutionensemencée
- technicien pas assez expérimenté
- pas de cause spécifique trouvée

Tous les échantillons confondus,

90 % des résultats sont satisfaisants pour le dénombrement de *L. monocytogenes*

100 % des résultats sont satisfaisants pour le dénombrement de *E. coli*

99 % des résultats sont satisfaisants pour le dénombrement de *Staphylococcus* coagulase positive

96 % des résultats sont satisfaisants pour le dénombrement de *B. cereus*

Un rapport intermédiaire a été envoyé à chaque laboratoire en version électronique le 20 juillet 2017. Le rapport final est envoyé le 23 novembre 2017 en version électronique. Une version papier est disponible sur demande.

Le prochain essai d'aptitude « dénombrement » sur une matrice spécifique sera organisé en juin 2018.