

# FINAAL RAPPORT

## PROFICIENCY TEST VOOR LEVENSMIDDELEN MICROBIOLOGIE JUNI 2012

**MATRIX: ZALM**

**TELLING**

Afdeling: Voedselpathogenen  
Marie Polet  
J. Wytsmanstraat 14  
1050 Brussel | België

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



Deze interlaboratoriumstudie was bestemd voor de laboratoria erkend door het FAVV.

## 1. Verloop van de studie

Maandag 4 juni 2012	transport van de pakketten door een chauffeur van het WIV naar de dispatchingcentra van het FAVV en ophalen van de stalen (Melle en Gembloux)
Dinsdag 5 juni 2012	start analyse door de verschillende laboratoria
Vrijdag 22 juni 2012	doorsturen van resultaten
Donderdag 19 juli 2012	Intermediair verslag doorgestuurd aan de laboratoria door het WIV

Elk pakket bevatte:

- 4 potjes (1, 2, 3, 4) met elk ongeveer 20 g gemalen zalm
- temperatuurscontrole registratieapparaat (voor een paar laboratoria)
- een koelelement
- het nummer van het laboratorium



ILVO – VOEDING	Melle
SGS	Antwerpen
LALUG (LFMFP)	Gent
AGROLAB	Battice
LOVAP	Geel
ECCA	Merelbeke
IEM	Luik
QUALITY PARTNER	Herstal
EURACETA	Villers-le-Bouillet
FLVVM	Melle
LEQ	Bastogne
SERVACO FOOD CONTROL	Wetteren
SHA	Mouscron
LFSAGx	Gembloux
REQUASUD	Louvain-la-Neuve
LAVETAN	Turnhout
WIV	Brussel
BIOTOX	Jabbeke
LARECO	Marche-en-Famenne
AGRO-ANALYSES	Metz, Frankrijk
CHEMIPHAR	Brugge
CVVH	Vorst-Laakdal
BRULABO	Brussel
CARAH	Ath
MICROBIOMETRIX	Sint-Katelijne-Waver
HVS	Mons
SILLIKER	Merville, Frankrijk

27 laboratoria hebben deelgenomen.



## 2. Samenstelling van de stalen

De stalen werden voorbereid door het laboratorium Requasud (Louvain-la-Neuve) op maandag 4 juni.

De gebruikte zalm werd in een supermarkt gekocht en bevat een natuurlijke flora.

Deze zalm werd ook artificieel beënt met de volgende stammen:

- *Staphylococcus aureus* : HT0009, laboratorium Requasud
- *Pseudomonas aeruginosa* : ATCC 27853
- *Bacillus cereus* : HT0001, laboratorium Requasud
- *Listeria monocytogenes* : HT0010, laboratorium Requasud
- *Lactobacillus casei* : SI0008, laboratorium Requasud
- *E. coli* : SI0059, laboratorium Requasud

### Artificiële beënting van de 4 stalen:

De stalen werden beënt zodat een theoretische concentratie van x cfu/g per kiem wordt bekomen in de zalm.

[x] : concentratie in cfu/g

	<i>S. aureus</i>	<i>L. casei</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>Ps. aeruginosa</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>
1	500	5000	120	5000	/	/
2	500	65000	120	5000	1500	/
3	2500	65000	1200	5000	1500	120

De staal 4 was een blanco, niet artificieel beënt. Alleen de natuurlijke flora is aanwezig.



### 3. Analyse procedure

Voor 4 stalen werden de 6 parameters geanalyseerd. De procedure was identiek voor elke staal, namelijk:

- . 10g substaal afnemen uit het recipiënt en de moederoplossing (MO) vanaf dit substaal voorbereiden
- . Vervolgens, volg dezelfde procedures als de gebruikelijke routine analyses
- . Tellingen : mesofiele melkzuurbacteria, *Pseudomonas spp*, *L. monocytogenes*, coagulase + *Staphylococcus* (CPS), *B. cereus*, *E. coli*

6 laboratoria hebben de telling van mesofiele melkzuurbacteria niet uitgevoerd

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

1 laboratorium heeft de telling van *L. monocytogenes* niet uitgevoerd

2 laboratoria hebben de telling van coagulase + *Staphylococcus* niet uitgevoerd

10 laboratoria hebben de telling van *P. aeruginosa* niet uitgevoerd

2 laboratoria hebben de telling van *E. coli* niet uitgevoerd

### 4. Homogeniteit- en stabiliteitstest.

De stalen werden bereid op maandag 4 juni 2012.

Een homogeniteitstest werd uitgevoerd op dinsdag 5 juni 2012 met 5 potjes van staal 3, waarvoor elke parameter werd bepaald.

De test heeft bevestigd dat alle onderzochte parameters homogeen verdeeld waren.

	Gemiddelde waarde in log cfu/g	CV
<i>Bacillus cereus</i>	2,78	0,164
<i>Staphylococcus aureus</i>	3,52	0,03
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3,87	0,04
<i>Listeria monocytogenes</i>	3,05	0,04



Finaal rapport Proficiency Test 2012 | NRL Levensmiddelen microbiologie |

<i>Lactobacillus casei</i>	4,87	0,02
<i>Escherichia coli</i>	2,12	0,12

VC = variatie coëfficiënt

Daarenboven werd voor het versterken/bevestigen van de homogeniteitstest, de performantie van alle deelnemende laboratoria (z-score) voor elke parameter berekend op basis van de resultaten van de deelnemers. Op deze manier heeft de homogeniteit heel weinig effect op de performantie van een laboratorium.

De stabiliteitstest werd uitgevoerd op woensdag 6 juni op staal 3 in duplo.

	Gemiddelde waarde in log cfu/g
<i>Bacillus cereus</i>	2,64
<i>Staphylococcus aureus</i>	3,39
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3,69
<i>Listeria monocytogenes</i>	3,02
<i>Lactobacillus casei</i>	4,63
<i>Escherichia coli</i>	2,07

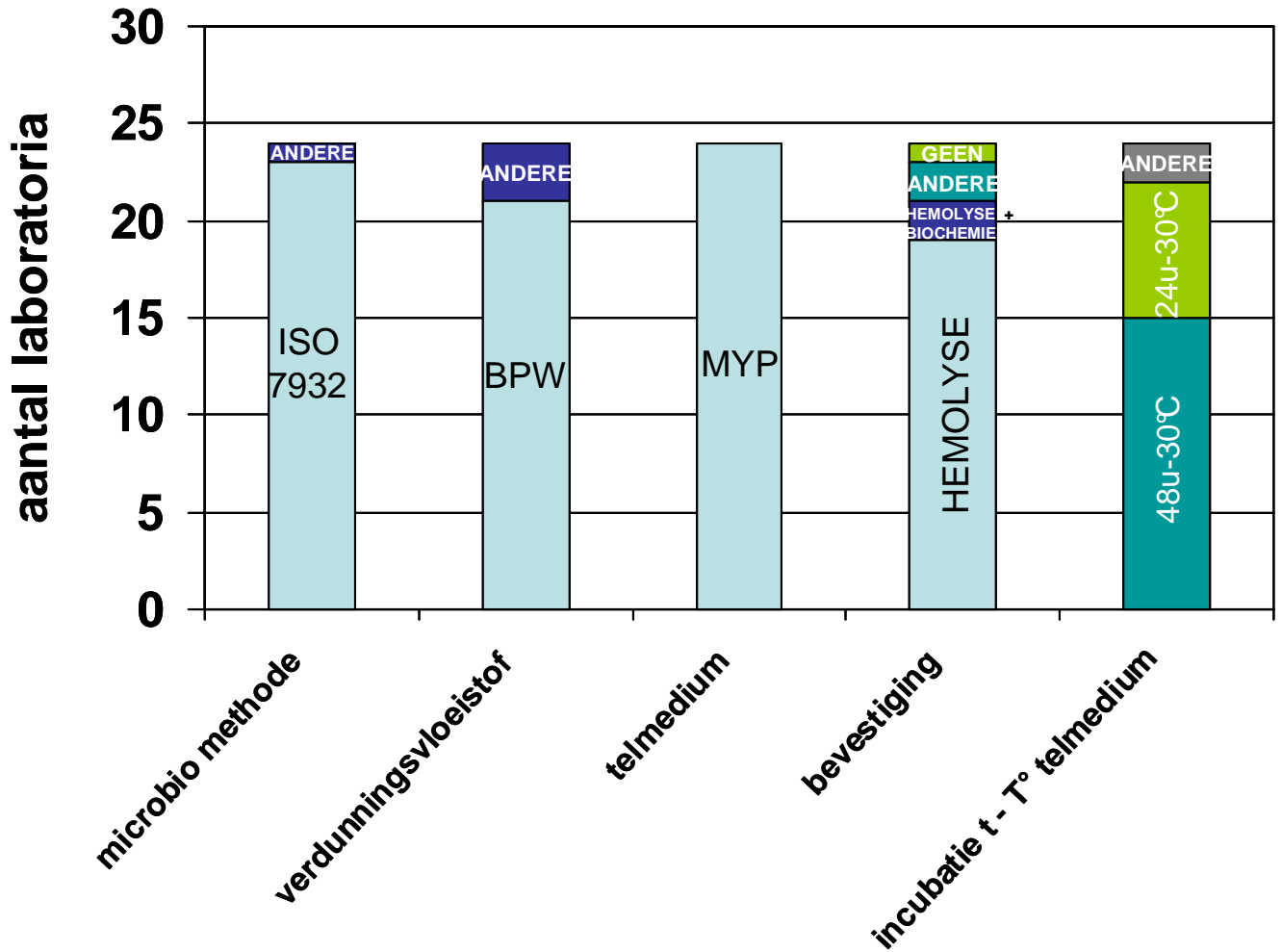
Alle parameters waren stabiel.

Het NRL heeft ook deelgenomen aan de proficiency test op 5 juni, dag van het begin van analyse voor alle laboratoria.



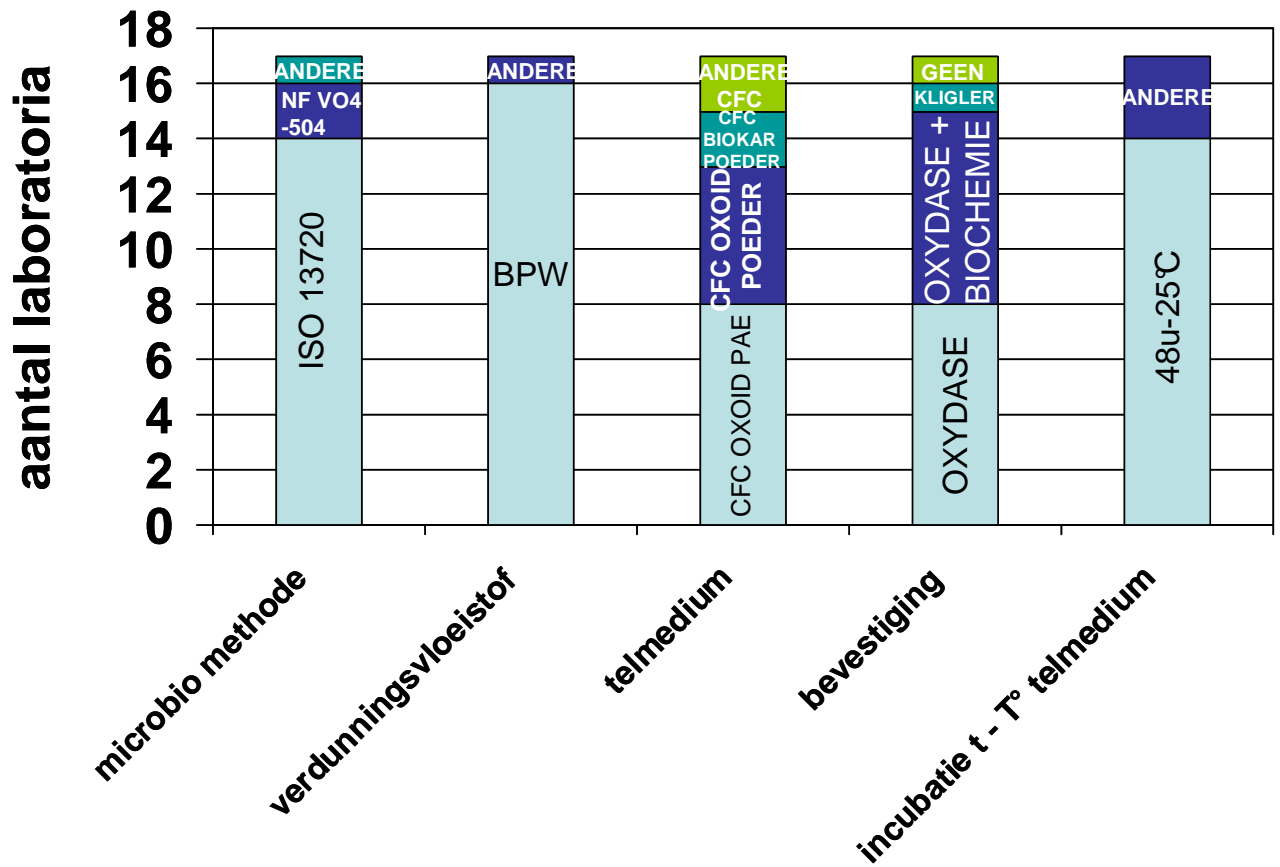
## 5. Samenvatting van de analyses

### *Bacillus cereus*





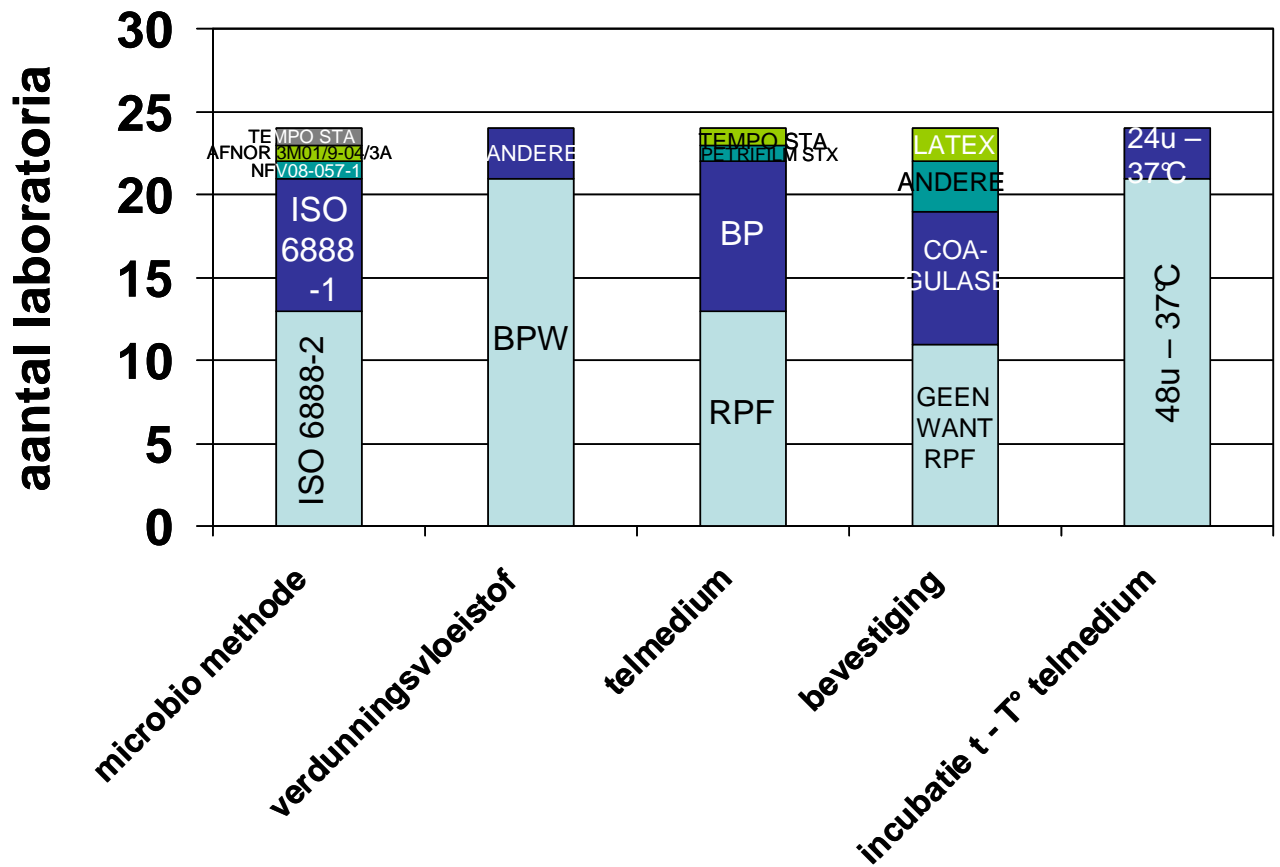
*Pseudomonas spp.*

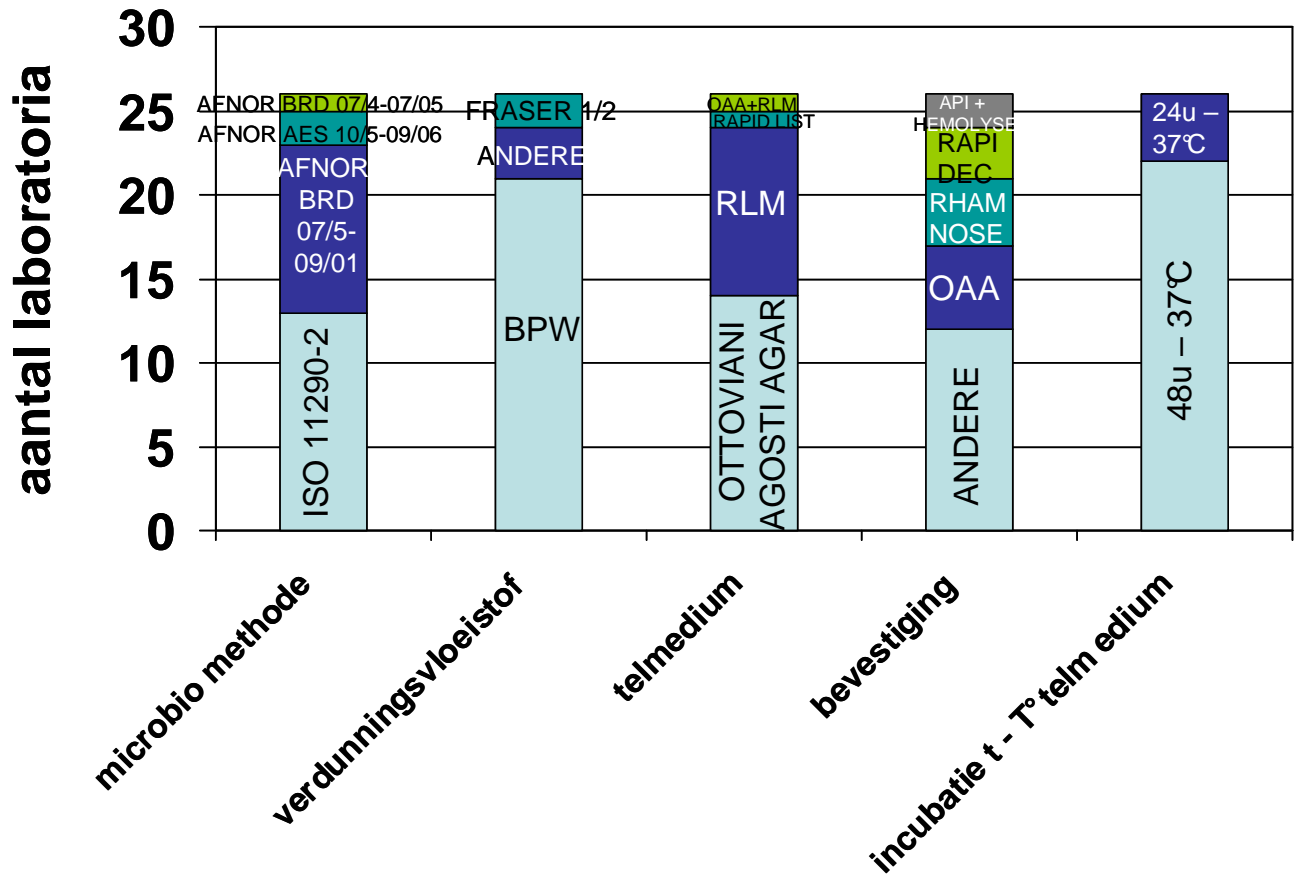






*Staphylococcus aureus*

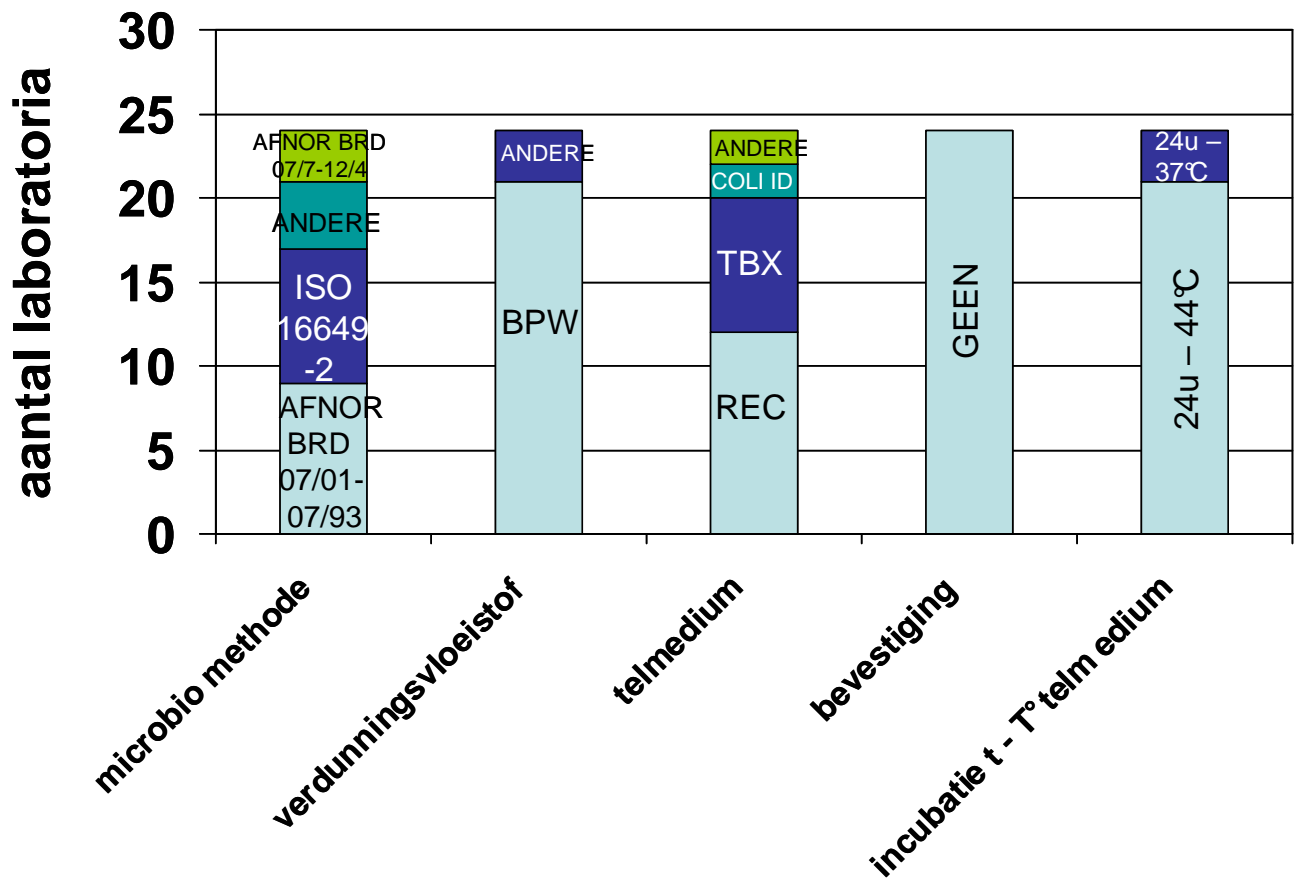


*Listeria monocytogenes*Bevestigingen « andere » *L. monocytogenes* :

- NA + Henry belichting + Gram test + katalase test + Microbact : 1
- Microgen + SIM + catalase test: 1
- RLM: 1
- hemolyse : 1
- hemolyse + rhamnose : 1
- OAA + Microbact : 1
- OAA + rhamnose : 1
- Microgen Listeria ID : 1
- Camp test + API Listeria : 1
- hemolyse + Gram test + catalase test + Camp test + suikers (rhamnose – xylose) : 1
- hemolyse + Gram test + catalase test + Camp test + API Listeria: 1
- geen: 1

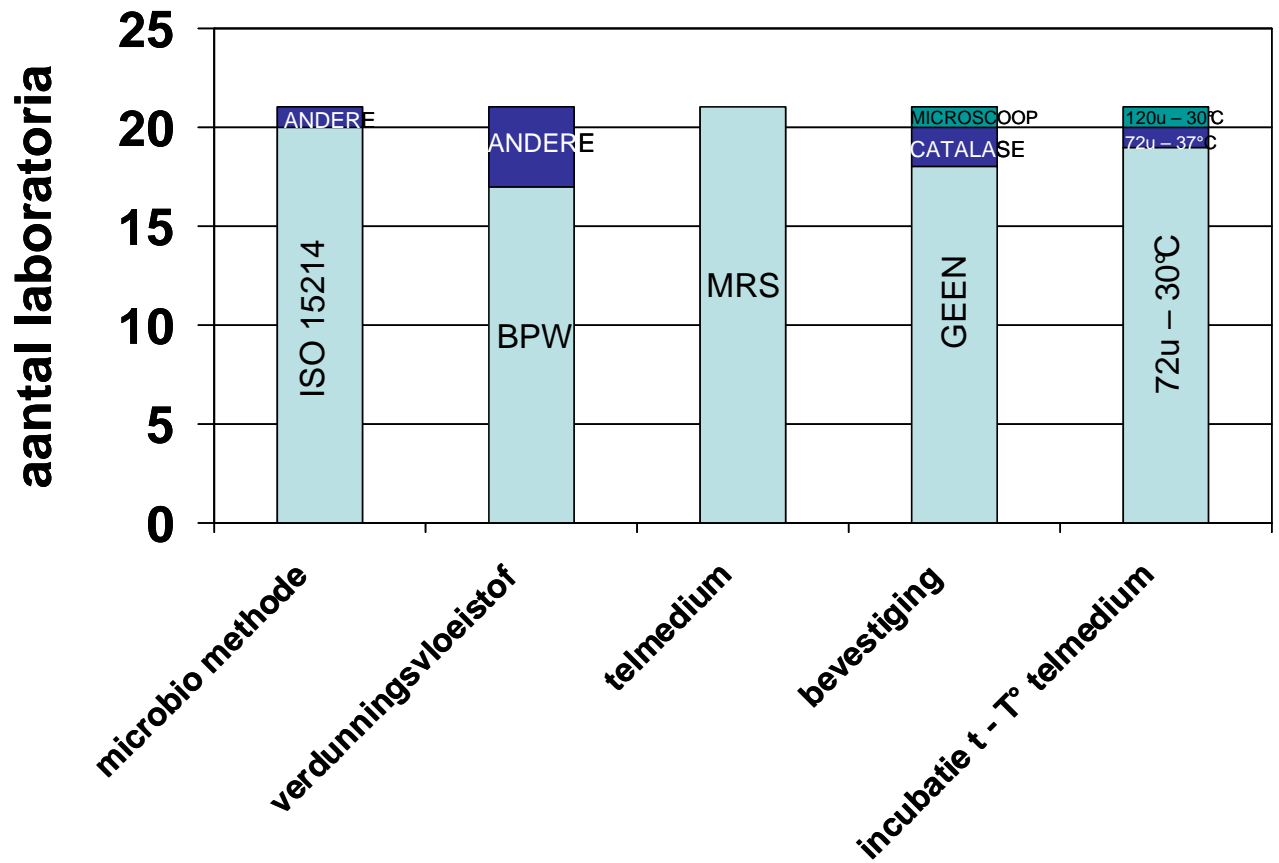


*Escherichia coli*





### Mesofiele melkzuurbacteria





## 6. Performantie van de laboratoria: z-scores

De z-score per parameter werd berekend met behulp van het robuuste gemiddelde en de robuuste standaarddeviatie van de resultaten van alle deelnemers.

### Samenvattende tabel van de z-scores van de laboratoria

n1labo	lactic1	lactic2	lactic3	bcereus2	bcereus3	lmono1	lmono2	lmono3
1	-0,696	-0,061	-0,052	0,602	0,690	0,832	0,236	0,402
2	-1,600	-0,757	-0,885	-0,231	0,191	0,832	1,392	0,616
3	0,100	0,684	-0,223	1,575	1,190	1,190	3,864	1,803
4	0,817	0,647	1,269	-0,390	-0,901	-0,741	0,819	1,198
5	-0,971	-1,437	-1,554	1,138	-0,149	-0,023	-0,905	1,004
6				-0,637	-0,374	0,136	0,819	-1,333
8	0,073	-0,964	-0,885			1,301	-0,905	-1,002
9	-1,064	0,607	-0,052	1,052	0,958	-2,545	-1,154	-1,492
10	0,073	-0,061	0,408	0,286	0,229	-1,653	-0,450	-0,076
12	1,343	1,684	1,327	0,543	1,190	-1,401	-2,016	-0,641
13	0,841	-1,808	-1,852	-1,817	-1,261	-0,188	-0,450	1,181
14	0,330	0,360	-0,283	-2,620	-2,920	-1,401	-0,241	-4,373
15	-1,262	0,087	-0,406	-0,870	-1,217	-0,547	0,325	-0,076
16	0,643	0,181	-1,199	-0,018	-1,717	-0,547	-0,450	-0,641
17				-0,269	-0,126	0,431	-1,154	0,616
18						0,136	1,257	-0,641
20						0,955	0,497	-0,076
21	0,841	0,607	0,003	-0,194	-0,246	0,136	-0,241	0,616
22				-0,711	-0,401			
23	-0,011	0,684	0,546	-0,686	-0,126	0,287	-0,450	-0,076
24	0,256	2,157	1,223	1,297	0,958	0,570	0,819	-1,333
27	-0,069	-0,011	1,040	-0,955	-0,246	0,703	-0,043	0,816
28	-0,677		-0,470		-0,246	-0,947		0,172
29	-1,210	-0,627	0,678	0,766	1,190	2,168	-1,154	-0,076
30	3,816	0,038	0,263	1,052	1,394	-0,363	-0,043	-0,076
33	0,643	-1,710	0,721	-0,543	-0,221	0,287	0,661	1,004
11				0,286	0,539	-0,188	0,819	-0,076

	Z-score tussen 2 en 3 of tussen -2 en -3
	Z-score > 3 of < -3
	niet uitgevoerd
	geen z-score te berekenen: resultaat onder de detectielimiet of niet interpreetbaar

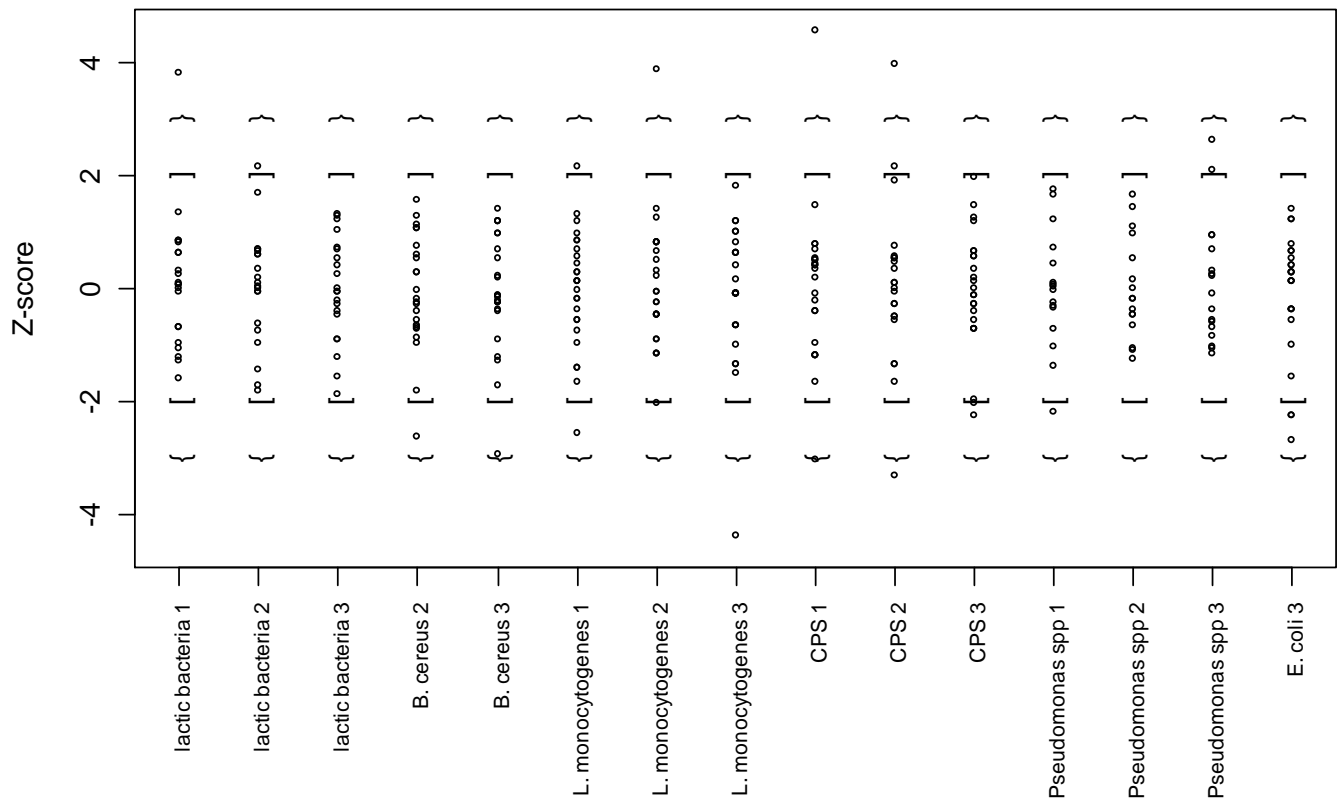


n <sup>o</sup> labo	cps1	cps2	cps3	pseudo1	pseudo2	pseudo3	ecoli3
1	-0,958	-1,637	0,177	-0,018	-0,448	-0,584	-1,003
2	1,455	2,168	-0,269				1,214
3	0,402	0,084	0,555	-0,292	-0,189	-0,360	0,792
4	4,560	3,966	-0,133	0,718	0,161	0,302	0,280
5	-0,086	-0,562	1,174	-1,356	-1,052	-1,157	-2,239
6							-2,680
8							
9	0,402	0,339	1,469	1,661	1,660	2,618	0,134
10	0,451	-0,261	-0,564	0,070	-0,007	0,241	-0,562
12	-1,172	-3,293	-0,726				0,674
13			-1,952	-1,011	-1,232	-1,065	0,550
14	-0,208	-0,051	-2,007		0,521	0,950	
15	0,772	0,520	-0,726	-0,244	-0,466	-0,542	-0,369
16	-1,172	-0,484	-0,269	-0,713	-0,655	-0,826	0,280
17	0,547	1,890	1,973				0,674
18	0,499	0,748	-2,241				0,419
20	-1,172	-1,338	1,251				0,134
21	0,196	-1,338	-0,133	0,101	-0,176	-0,104	1,400
22				-2,189	-1,093	-1,022	
23	0,772	0,460	0,653	1,212	1,098	0,950	0,419
24	-3,029	0,520	0,653	1,743	1,453	2,106	-0,369
27	0,684	-0,261	0,346				0,280
28	0,352		-0,005	0,426		0,693	-1,543
29	-0,402	0,578	-0,412	0,049	0,969	0,213	0,134
30	-1,661	0,084	0,555				1,214
33	-0,402	-0,484	-0,726	-0,343	-0,379	-0,691	-2,239
11	0,499	0,017	0,118				-0,369
11	-1,661	2,533	0,653				0,674

- Z-score tussen 2 en 3 of tussen -2 en -3
- Z-score > 3 of < -3
- niet uitgevoerd
- geen z-score te berekenen:  
resultaat onder de detectielimiet of niet interpreetbaar



Grafiek met de z-scores van de laboratoria



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

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



## 7. Standaarddeviaties

Hierbij ter informatie een vergelijkende tabel van de standaarddeviaties van deze ringtest met deze van de RAEMA 38 en 44.

	gemiddelde robuuste SD WIV juni 2012	gemiddelde robuuste SD RAEMA 38	gemiddelde robuuste SD RAEMA 44
<i>B. cereus</i>	0,26	0,25	/
<i>S. coagulase +</i>	0,15	0,15	0,22
<i>L. monocytogenes</i>	0,13	/	0,14
<i>Pseudomonas spp</i>	0,50	/	/
<i>E. coli</i>	0,18	0,28	0,17
Mesofiele melkzuurbacteria	0,18	0,25	/

SD=standaarddeviatie

De gemiddelde standaarddeviatie van *Pseudomonas spp* is groot in vergelijking met de andere parameters. Dit kan één van de redenen zijn waarom voor alle laboratoria hun z-scores tussen de limieten (-3 ; +3) liggen.

Met behulp van de dienst “Kwaliteit van de medische laboratoria” van het WIV, hebben we de resultaten van de laboratoria voor deze parameter geanalyseerd om te begrijpen waarom deze standaarddeviatie hoog is.

- 1) Deze hoge variabiliteit kan een gevolg zijn van de heterogeniteit van de staal enerzijds of door de spreiding van de resultaten tussen de laboratoria, anderzijds. Indien we de stalen onderling vergelijken zal de grafische verspreiding (scatter plot) van de resultaten van al de laboratoria voor deze parameter een wolk (zonder richting) geven in het eerste geval en een spreiding met een duidelijke richting in het tweede geval geven, wat betekent dat al de laboratoria die een hoog resultaat (of zwak) hebben voor een staal ook een hoog resultaat (of zwak) hebben voor hun andere stalen.

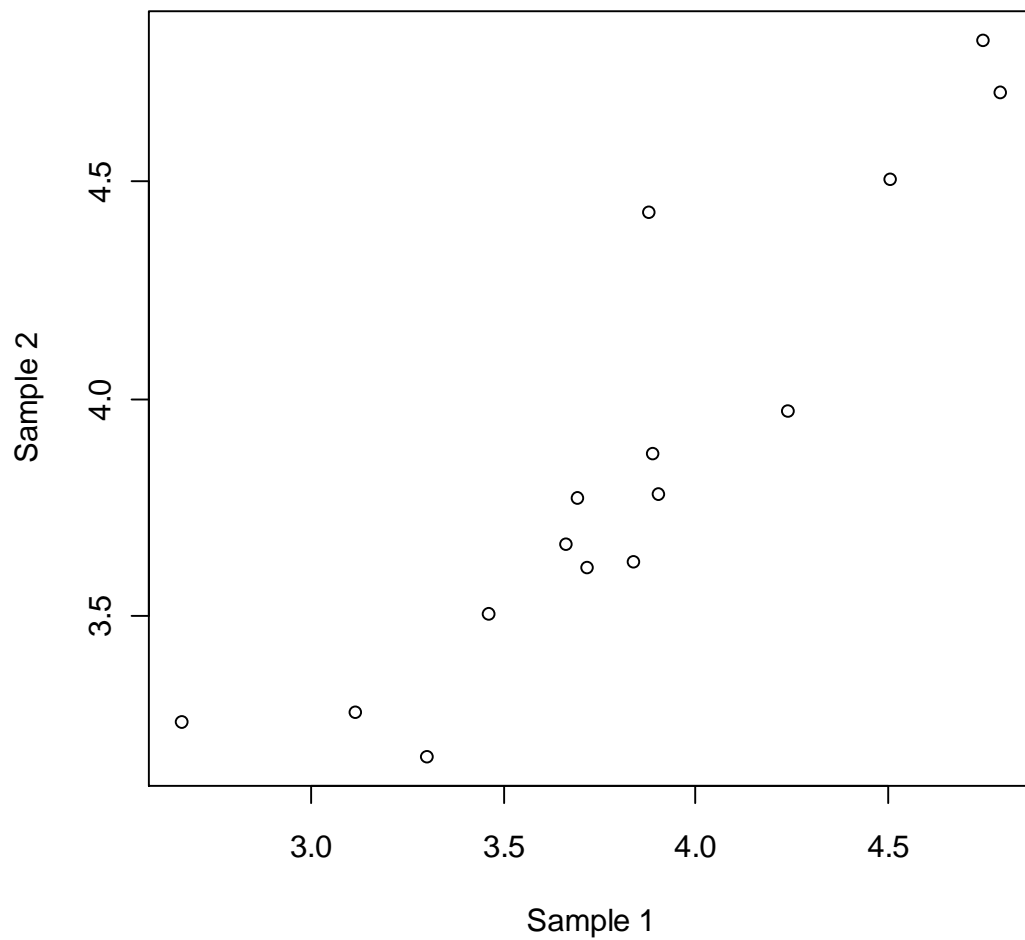
Zie grafieken 1, 2 en 3.





Grafiek 1

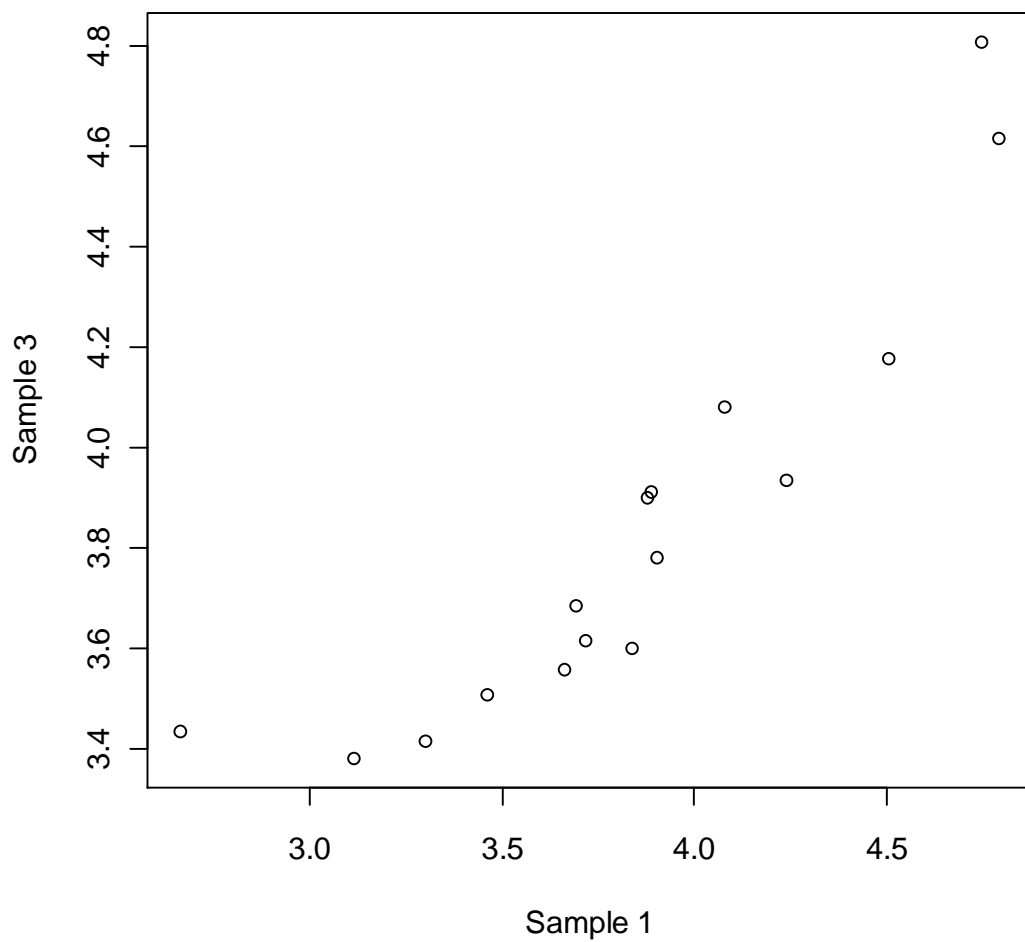
**Pseudomonas spp (Log CFU/g)**





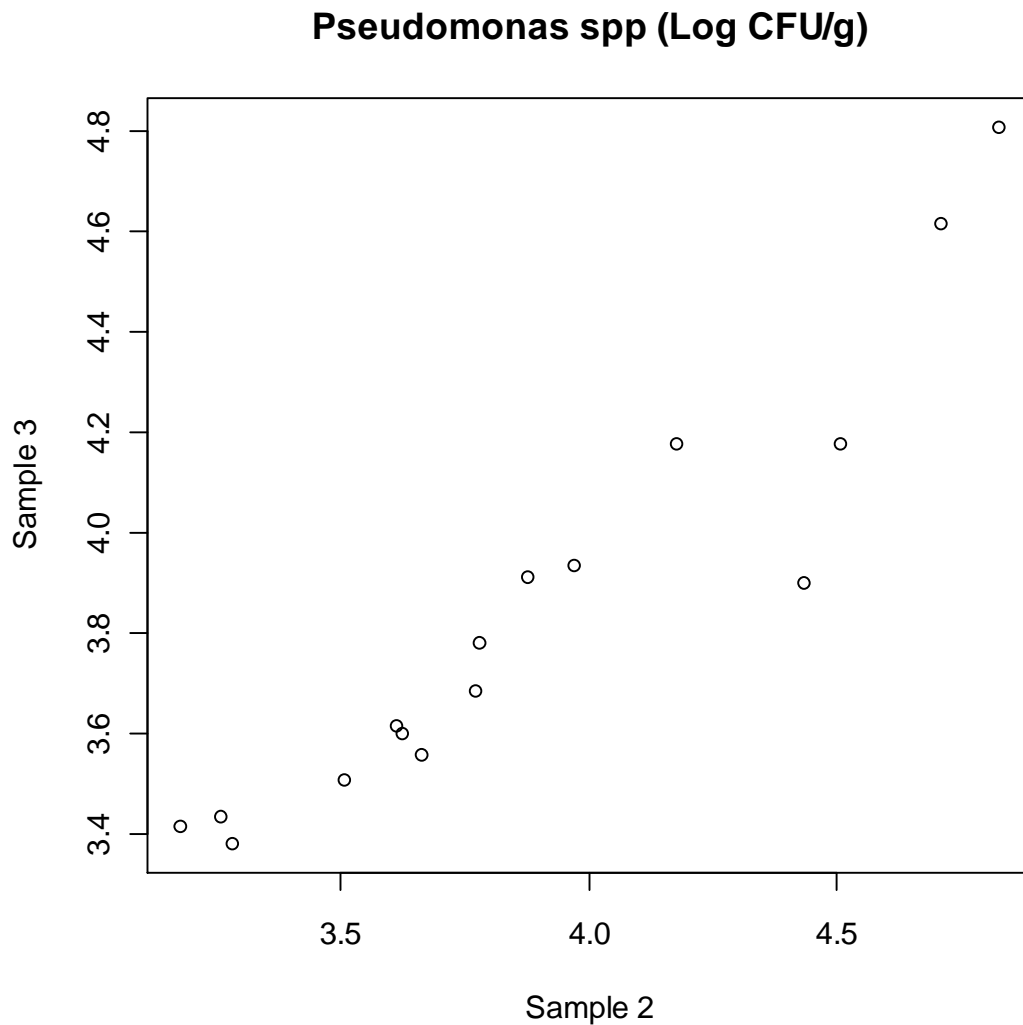
Grafiek 2

**Pseudomonas spp (Log CFU/g)**





Grafiek 3

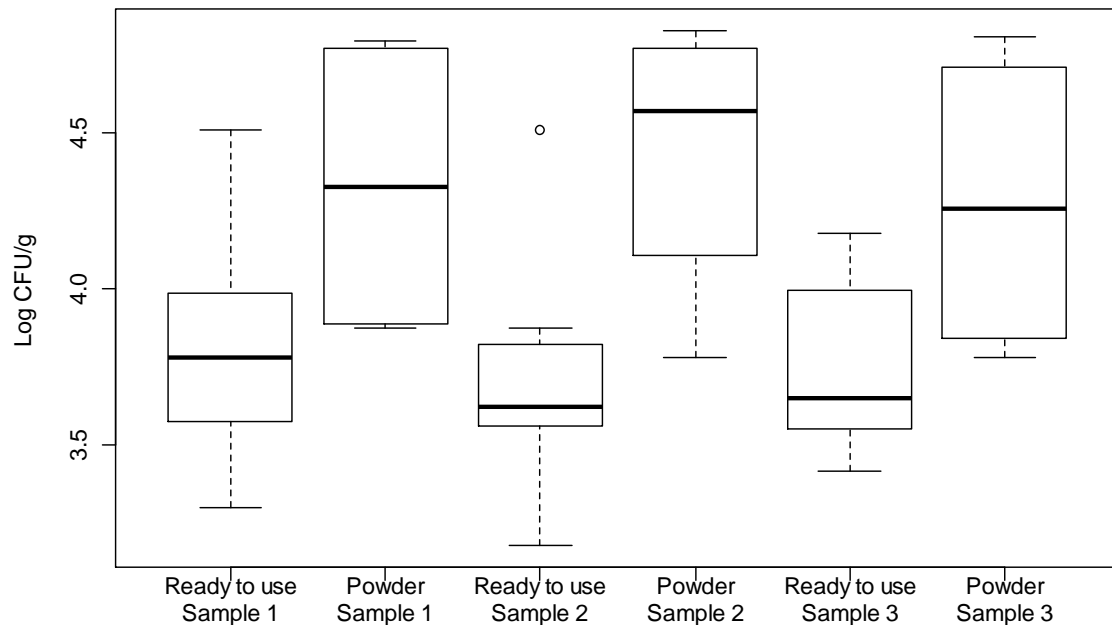


In de 3 grafieken heeft de spreiding een duidelijke richting. De hoge standaarddeviatie is dus te wijten aan een variatie van de resultaten tussen de laboratoria onderling en niet aan een heterogeniteit van de staal.



- 2) Daarentegen, indien we kijken naar de box-plots verkregen uit de vergelijking van de resultaten van 12 laboratoria (op 17 deelnemers) volgens het gebruikte medium (Oxoid poedervorm versus Oxoid klaar-voor-gebruik), merken we op dat de laboratoria die een medium in poedervorm gebruiken hogere waarden bekomen dan de laboratoria die een kant-en-klaar medium gebruiken. Deze waarden liggen ook hoger dan het inoculatie-niveau. Zie grafiek 4.

Grafiek 4.



P-waarden :

Staal 1: 0.07273

Staal 2: 0.04242

Staal 3: 0.01091

Het verschil is significant wanneer de p-waarde kleiner is dan 0,05.

Dit is niet het geval voor al de stalen maar er is een trend naar mogelijke verschillen gebonden met het type medium dat werd gebruikt, dit aangezien de p-waarden nabij de limietwaarde zit van 0.05 voor significante verschillen.



- 3) Hypothese: het medium van Oxoid in poedervorm laat andere kiemen verschillend van *Pseudomonas spp.* toe om te groeien op het medium. De hogere waarden van de laboratoria die een medium in poedervorm gebruikten voor de telling komen mogelijk voort uit de aanwezigheid van andere kiemen dan *Pseudomonas spp.* (natuurlijke flora van de zalm) op het telmedium, wat leidt tot een grotere moeilijkheid om de kolonies te tellen en bevestigen bij een onvoldoend aantal verdunningen. Indien de bevestiging van de kolonies niet correct uitgevoerd werd, ligt het resultaat mogelijk hoger dan verwacht.

## 8. Conclusies

De analyse van de resultaten van een proficiency test berust niet enkel op de individuele performantie van ieder laboratorium. Dit wordt duidelijk uit het gemiddelde van de standaarddeviaties van de analyses van *Pseudomonas*. Vandaar dat het belangrijk is om de analysemethode gebruikt door ieder laboratorium te kennen.

Staal n°4 was een blanco staal, natuurlijk besmet en niet artificieel beënt. We hebben de resultaten van dit staal niet gebruikt bij de verwerking van de gegevens.

Het tussentijdse verslag in bijlage verschilt licht met het rapport dat doorgestuurd werd in juli wat betreft de standaarddeviatie van de telling van melkzuurbacteria van staal 1, maar dit heeft geen invloed op het resultaat van de laboratoria.

Een elektronische versie van het tussentijdse verslag werd op 19 juli naar ieder laboratorium gestuurd. De papieren versie van het eindrapport werd op eind oktober 2012 verstuurd.

De volgende proficiency test zal in juni 2013 georganiseerd worden.