

RAPPORT FINAL

TEST D'APTITUDE EN MICROBIOLOGIE ALIMENTAIRE
JUN 2012

MATRICE: SAUMON

DENOMBREMENT

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

www.wiv-isp.be





Cette étude inter-laboratoire était destinée aux laboratoires agréés par l'AFSCA.

1. Déroulement de l'étude

Lundi 4 juin 2012	transport des colis vers les 2 dispatchings de l'AFSCA par un chauffeur de l'ISP et retrait des échantillons (Melle et Gembloux)
Mardi 5 juin 2012	laboratoires débutent les analyses
Vendredi 22 juin 2012	date limite pour rendre les résultats à l'ISP
Jeudi 19 juillet 2012	rapport intermédiaire envoyé aux laboratoires par l'ISP

Chaque colis contenait :

- 4 pots (1, 2, 3, 4) contenant chacun environ 20 g de saumon mixé
- un traceur de température (pour quelques laboratoires)
- un bloc réfrigérant
- le n° du laboratoire



ILVO – VOEDING	Melle
SGS	Anvers
LALUG (LFMFP)	Gand
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
REQUASUD	Louvain-la-Neuve
LAVETAN	Turnhout
ISP	Bruxelles
BIOTOX	Jabbeke
LARECO	Marche-en-Famenne
AGRO-ANALYSES	Metz, France
CHEMIPHAR	Bruges
CVVH	Vorst-Laakdal
BRULABO	Bruxelles
CARAH	Ath
MICROBIOMETRIX	Sint-Katelijne-Waver
HVS	Mons
SILLIKER	Merville, France

27 laboratoires ont participé.



2. Composition des échantillons

Les échantillons ont été préparés par le laboratoire Requasud (Louvain-la-Neuve) le lundi 4 juin.

Le saumon utilisé a été acheté en grand magasin et contient donc une flore naturellement présente. Ce saumon a par ailleurs été contaminé de manière artificielle avec les souches suivantes :

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

Contamination artificielle des 4 échantillons :

Les échantillons ont été contaminé afin d'obtenir une concentration théorique de x cfu/g par germe dans le saumon.

[x] : concentration en 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

L'échantillon 4 est un échantillon blanc, non contaminé artificiellement. Seule la flore naturelle est présente.



3. Procédure d'analyse

Pour les 4 échantillons, 6 paramètres ont été analysés. 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 : bactéries lactiques mésophiles, *Pseudomonas spp*, *L. monocytogenes*, *Staphylococcus coagulase + (CPS)*, *B. cereus*, *E. coli*

6 laboratoires n'ont pas effectué le dénombrement des bactéries lactiques mésophiles

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

1 laboratoire n'a pas effectué le dénombrement de *L. monocytogenes*

2 laboratoires n'ont pas effectué le dénombrement de *Staphylococcus coagulase +*

10 laboratoires n'ont pas effectué le dénombrement de *P. aeruginosa*

2 laboratoires n'ont pas effectué le dénombrement d'*E. coli*

4. Test d'homogénéité et de stabilité

Les échantillons ont été préparés le lundi 4 juin.

Le mardi 5 juin, un test d'homogénéité a été réalisé sur 5 pots de l'échantillon 3, pour chaque paramètre. Tous les paramètres étaient homogènes.

	Valeurs moyennes en 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



Rapport final test d'aptitude dénombrement 2012 | LNR Microbiologie alimentaire |

<i>Listeria monocytogenes</i>	3,05	0,04
<i>Lactobacillus casei</i>	4,87	0,02
<i>Escherichia coli</i>	2,12	0,12

CV = coefficient de variation

De plus, pour conforter notre test d'homogénéité, la performance de tous les laboratoires participants (z-score) pour chaque paramètre est calculée sur base des résultats des laboratoires participants. De cette manière, l'homogénéité des échantillons a très peu d'impact sur la performance d'un laboratoire.

Les tests de stabilité ont été réalisés le mercredi 6 juin sur l'échantillon 3 en double.

	Valeurs moyennes en 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

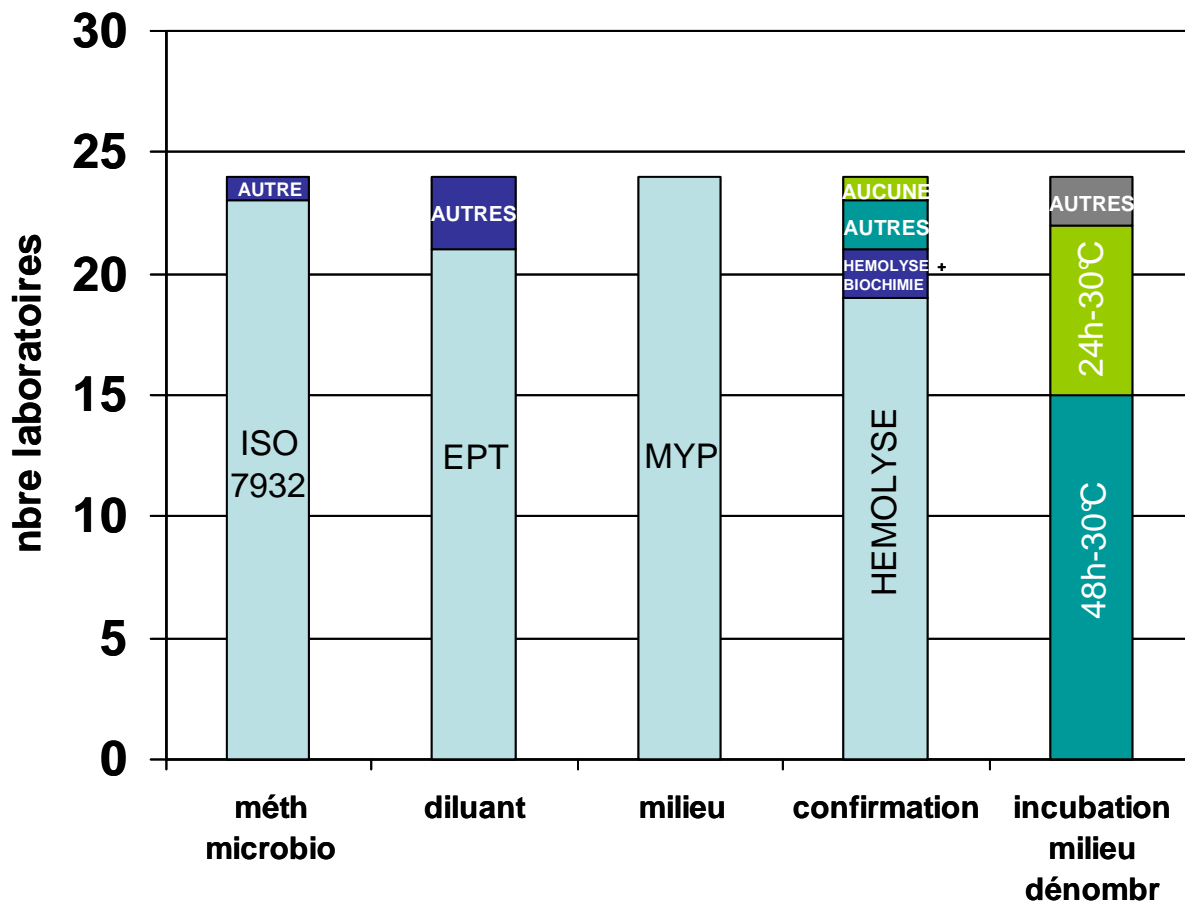
Tous les paramètres étaient stables.

Le LNR a aussi participé à l'essai d'aptitude le 5 juin, jour du début des analyses pour tous les laboratoires.



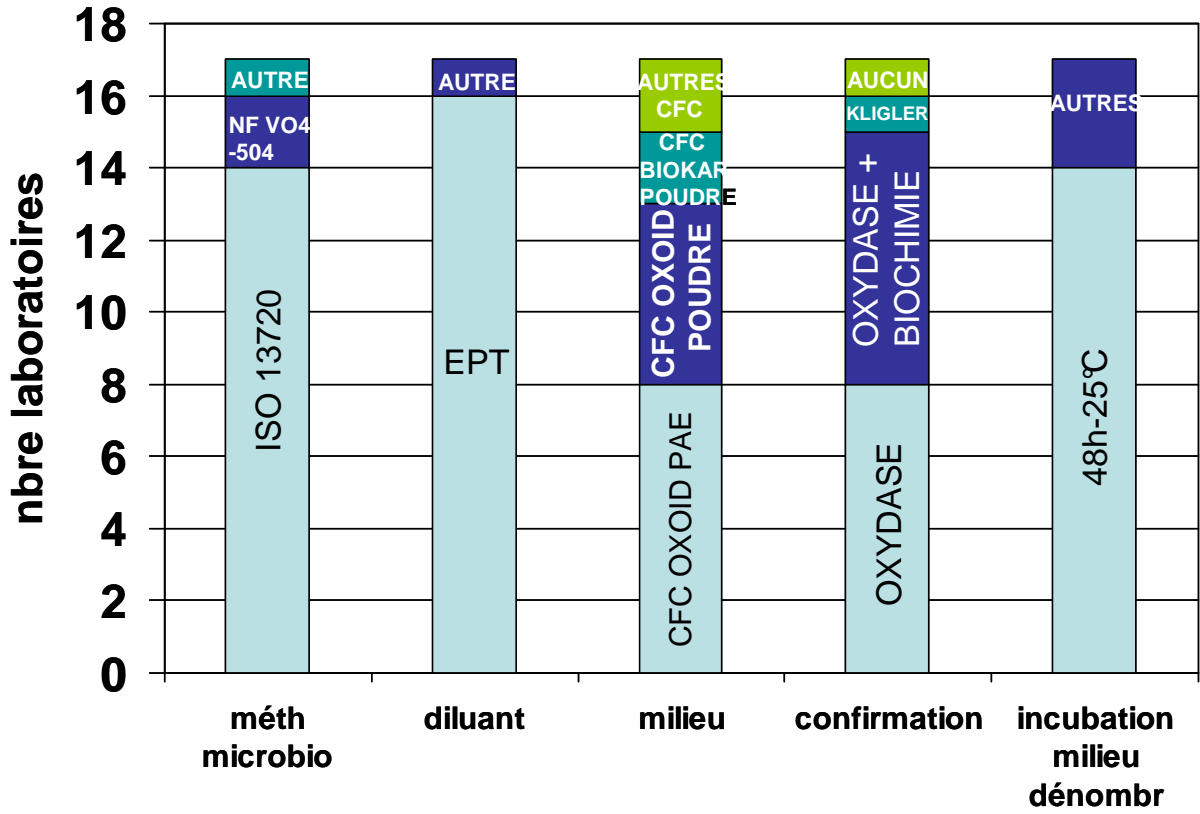
5. Compte-rendu des analyses

Bacillus cereus



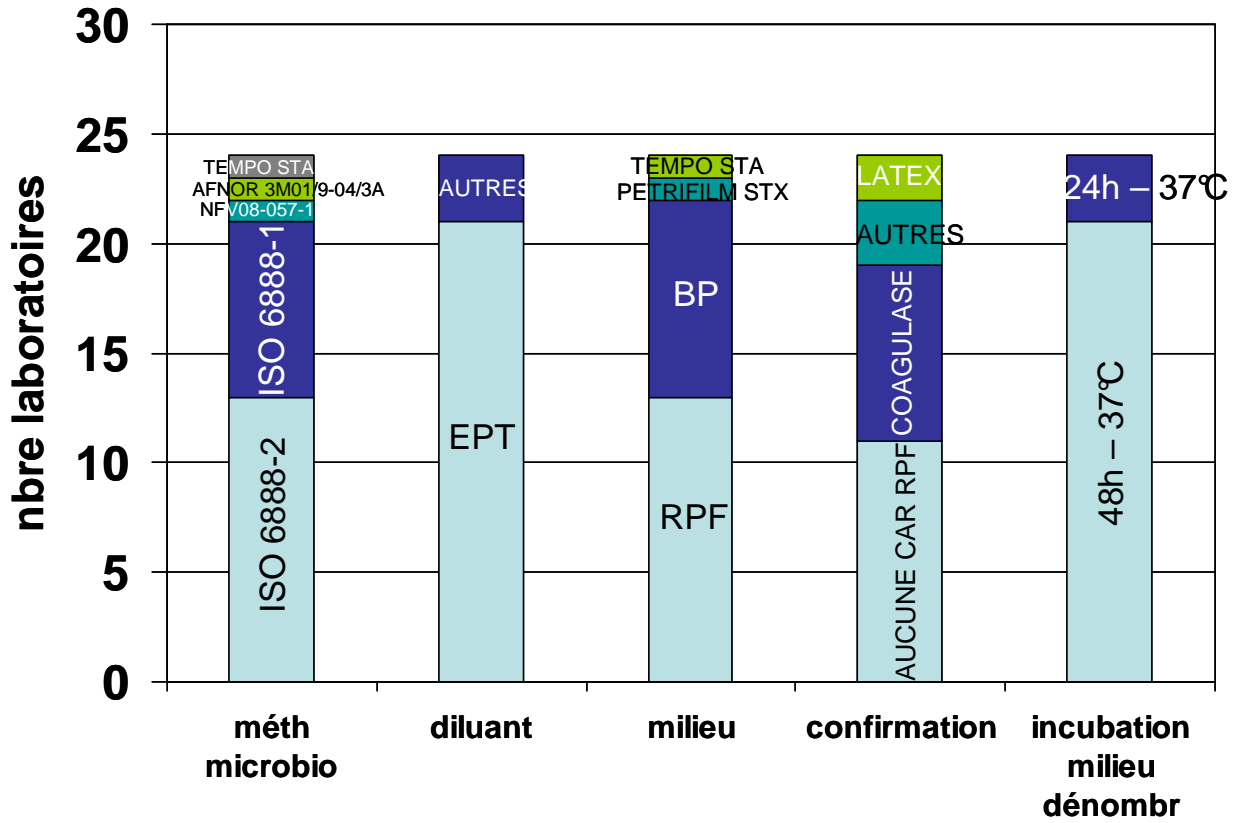


Pseudomonas spp.



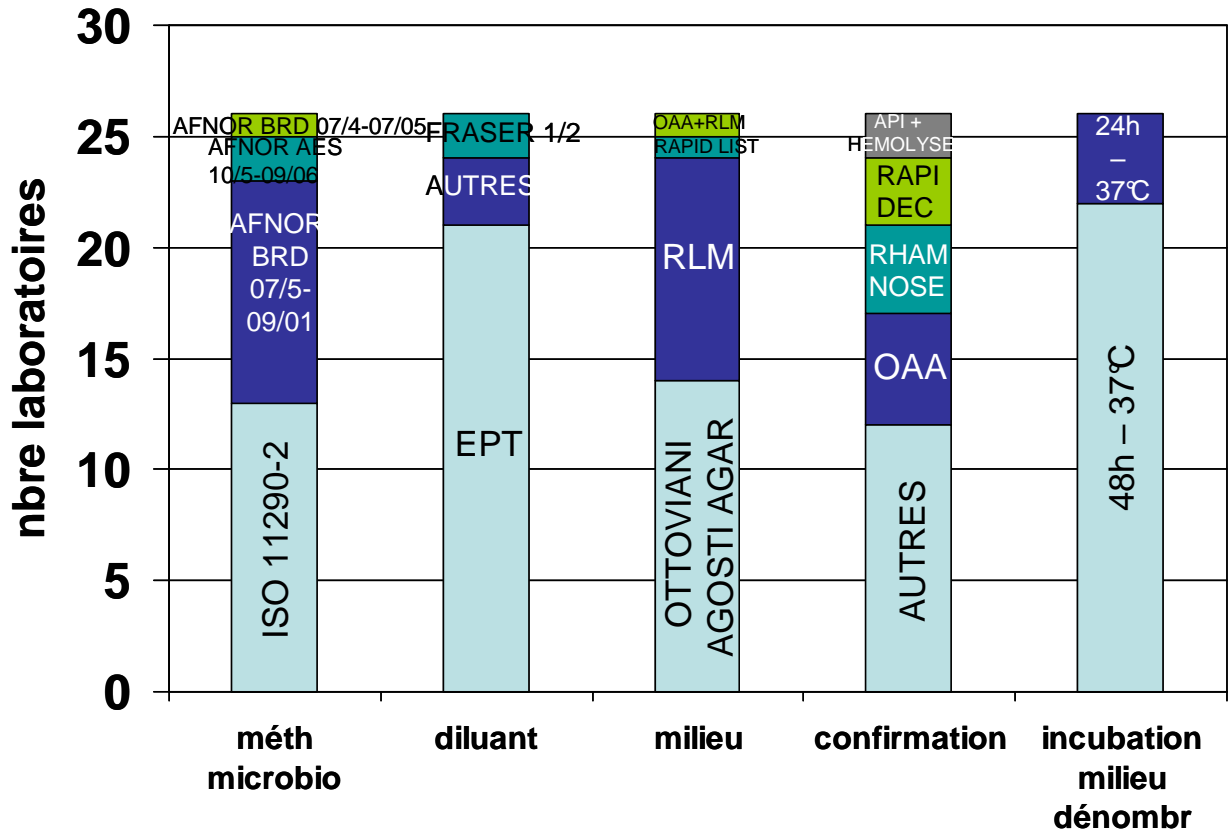


Staphylococcus aureus





Listeria monocytogenes

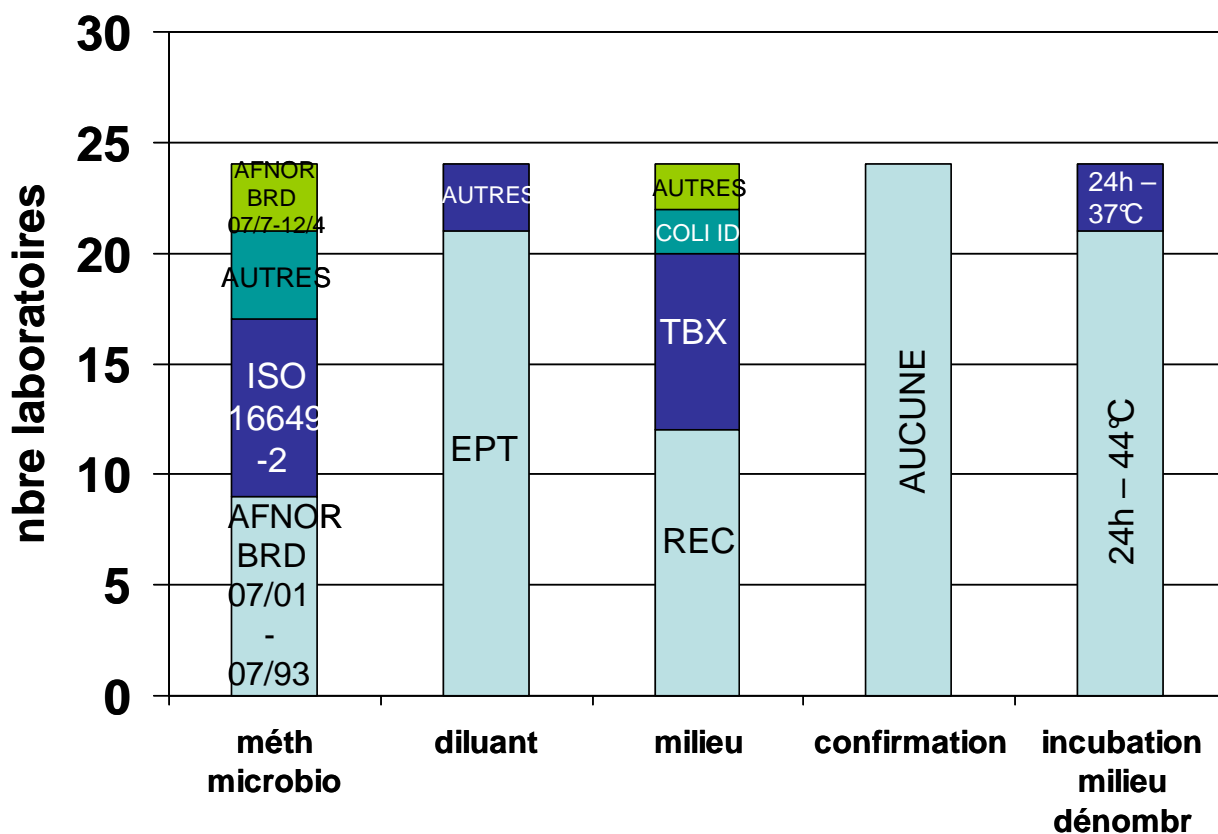


Confirmations « autres » *L. monocytogenes* :

- NA + illumination de Henry + test de Gram + test catalase + Microbact : 1
- Microgen + SIM + test catalase : 1
- RLM : 1
- hémolyse : 1
- hémolyse + rhamnose : 1
- OAA + Microbact : 1
- OAA + rhamnose : 1
- Microgen Listeria ID : 1
- test de Camp + API Listeria : 1
- hémolyse + test de Gram + test catalase + test de Camp + sucres (rhamnose - xylose) : 1
- hémolyse + test de Gram + test catalase + test de Camp + API Listeria : 1
- aucune : 1

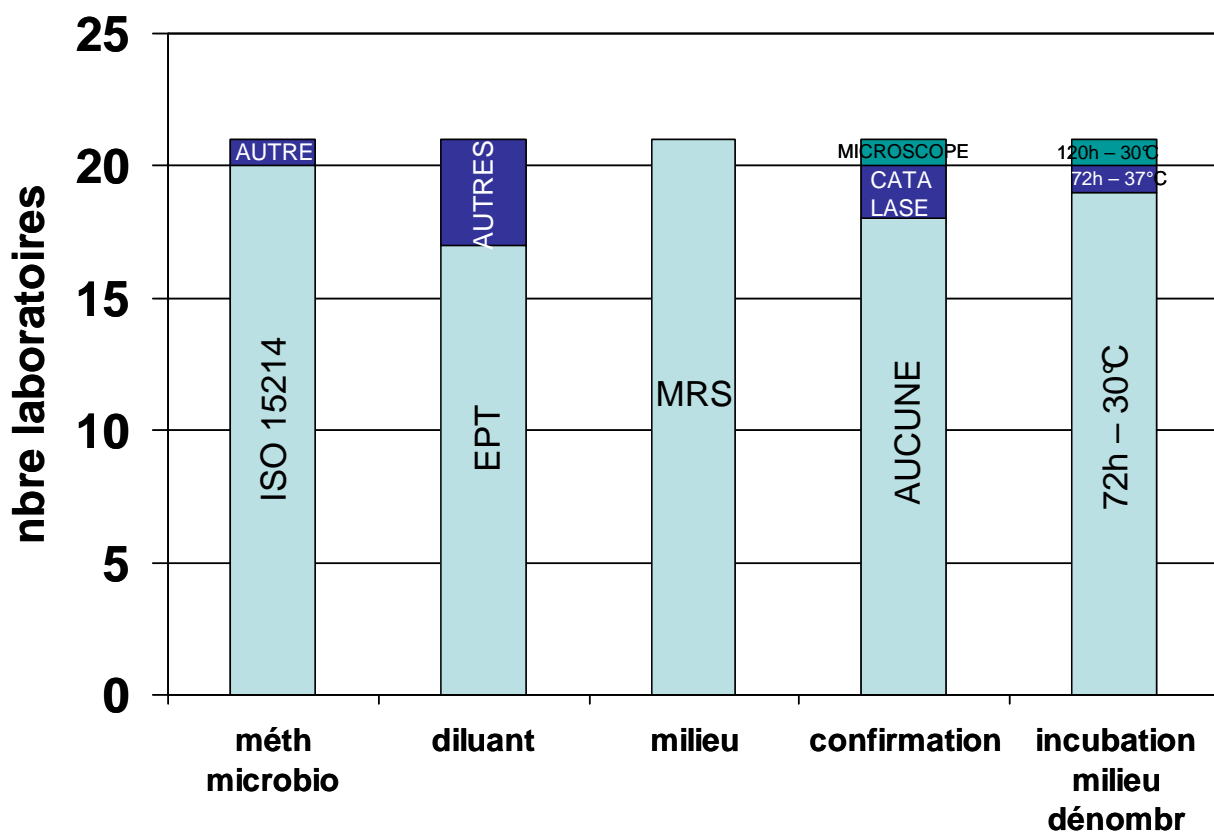


Escherichia coli





Bactéries lactiques mésophiles





6. Performance des laboratoires : z-scores

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

n°labo	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 entre 2 et 3 ou entre -2 et -3
	Z-score > 3 ou < -3
	non réalisé
	pas de z-score à calculer car résultat sous la limite de détection ou non interprétable

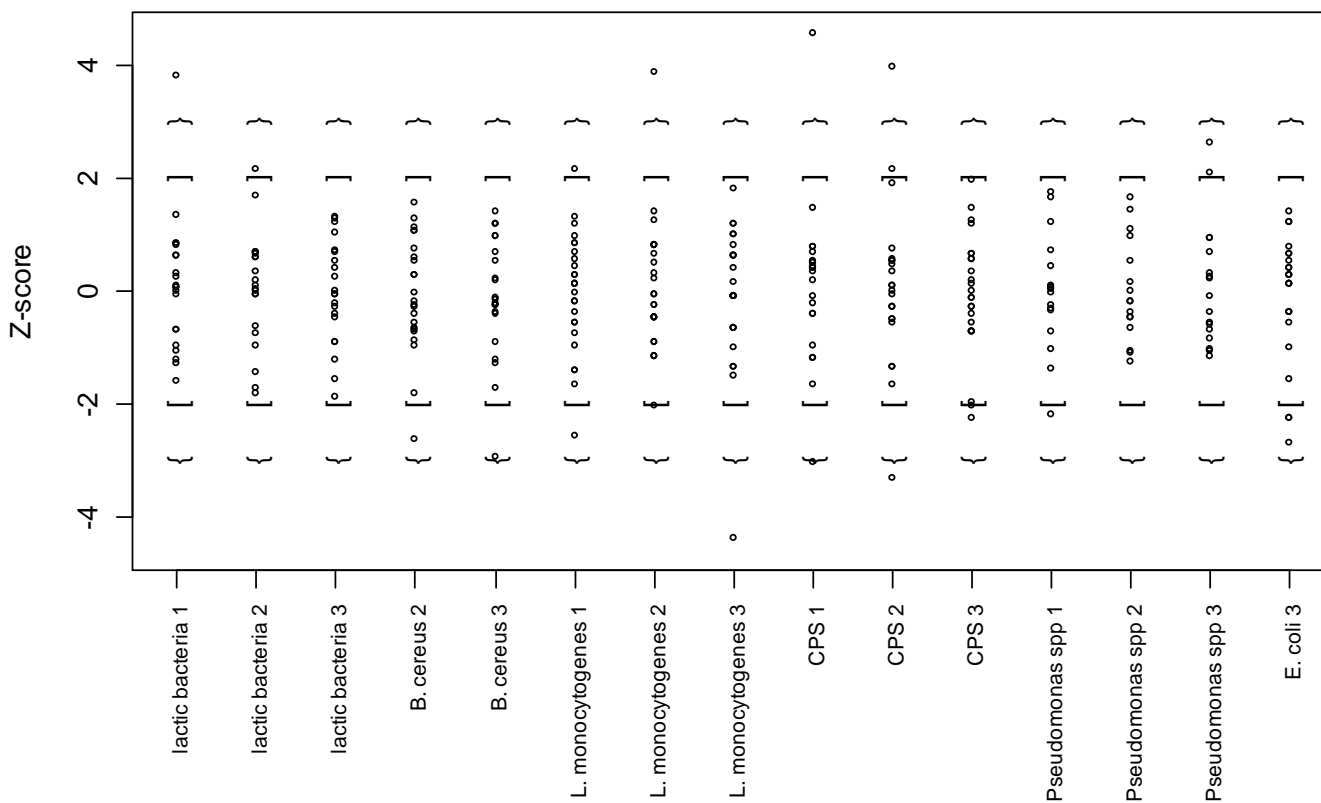


n°labo	cps1	cps2	cps3	pseudo1	pseudo2	pseudo3	ecoli3
1	-0,958	-1,637	0,177	-0,018	-0,448	-0,584	-1,003
2	1,455	2,168	-0,269				1,214
3	0,402	0,084	0,555	-0,292	-0,189	-0,360	0,792
4	4,560	3,966	-0,133	0,718	0,161	0,302	0,280
5	-0,086	-0,562	1,174	-1,356	-1,052	-1,157	-2,239
6							-2,680
8							
9	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 entre 2 et 3 ou entre -2 et -3
 Z-score > 3 ou < -3
 non réalisé
 pas de z-score à calculer car
 résultat sous la limite de détection
 ou non interprétable



Graphique des z-scores des laboratoires



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

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



7. Ecart-types

Voici à titre indicatif un tableau comparatif des écarts-types de cet essai avec ceux des RAEMA 38 et 44.

	moyenne SD robustes ISP juin 2012	moyenne SD robustes RAEMA 38	moyenne SD robustes 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
bactéries lactiques mésophiles	0,18	0,25	/

SD=écart-type

L'écart-type moyen de *Pseudomonas spp* est assez élevé par rapport aux autres paramètres. Cela peut être une des raisons pour laquelle tous les laboratoires ont leurs z-scores entre les limites (-3 ; +3).

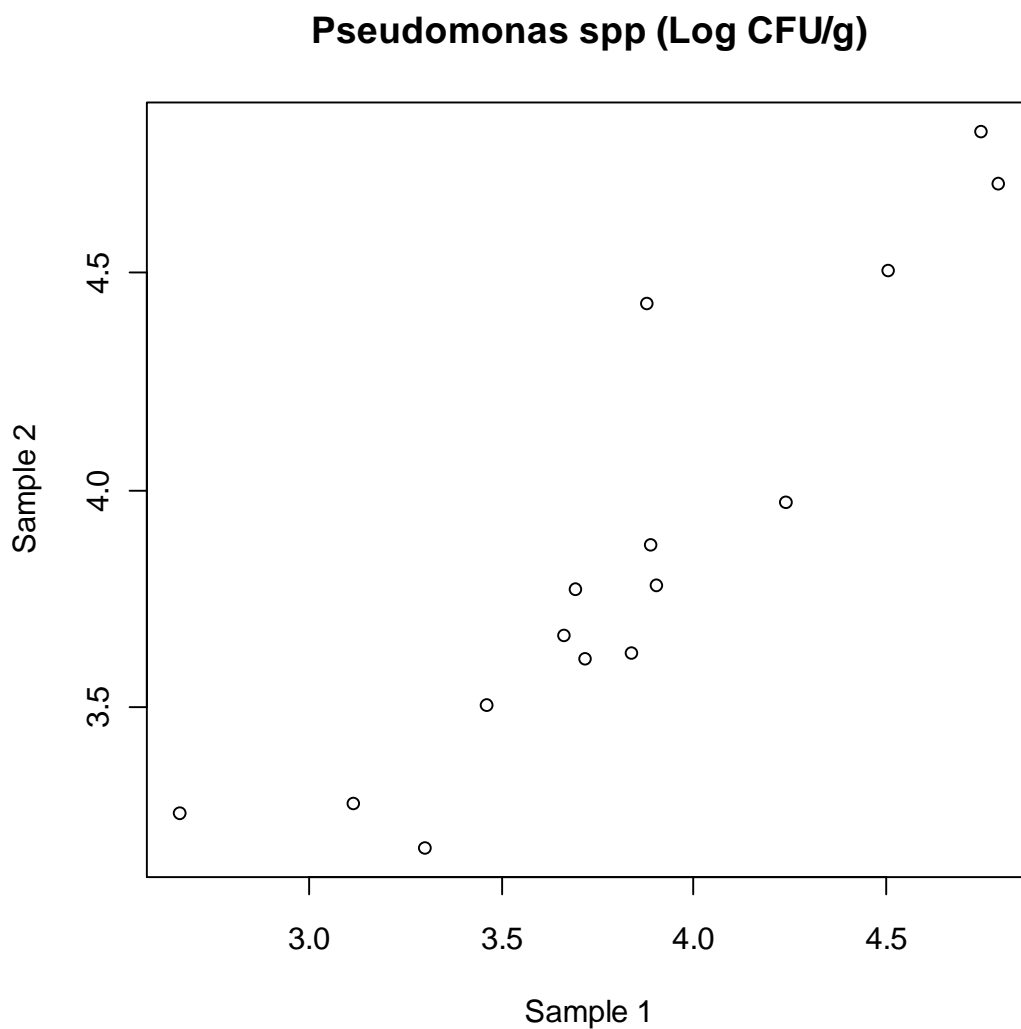
Avec l'aide du service « Qualité des laboratoires médicaux » de l'ISP, nous avons analysé les résultats des laboratoires pour ce paramètre afin de comprendre pourquoi la valeur de l'écart-type est élevée

- 1) Cette haute variabilité peut être causée soit par l'hétérogénéité de l'échantillon soit par la dispersion des résultats entre les laboratoires. En comparant un échantillon à un autre, la distribution graphique (scatter plot) des résultats de tous les laboratoires pour ce paramètre donnera un nuage sans direction dans le 1^{er} cas et une direction claire dans le deuxième cas, c'est-à-dire que les laboratoires qui ont un résultat élevé (ou faible) pour un échantillon ont un résultat élevé (ou faible) pour les autres échantillons.

Voir graphiques 1, 2 et 3.



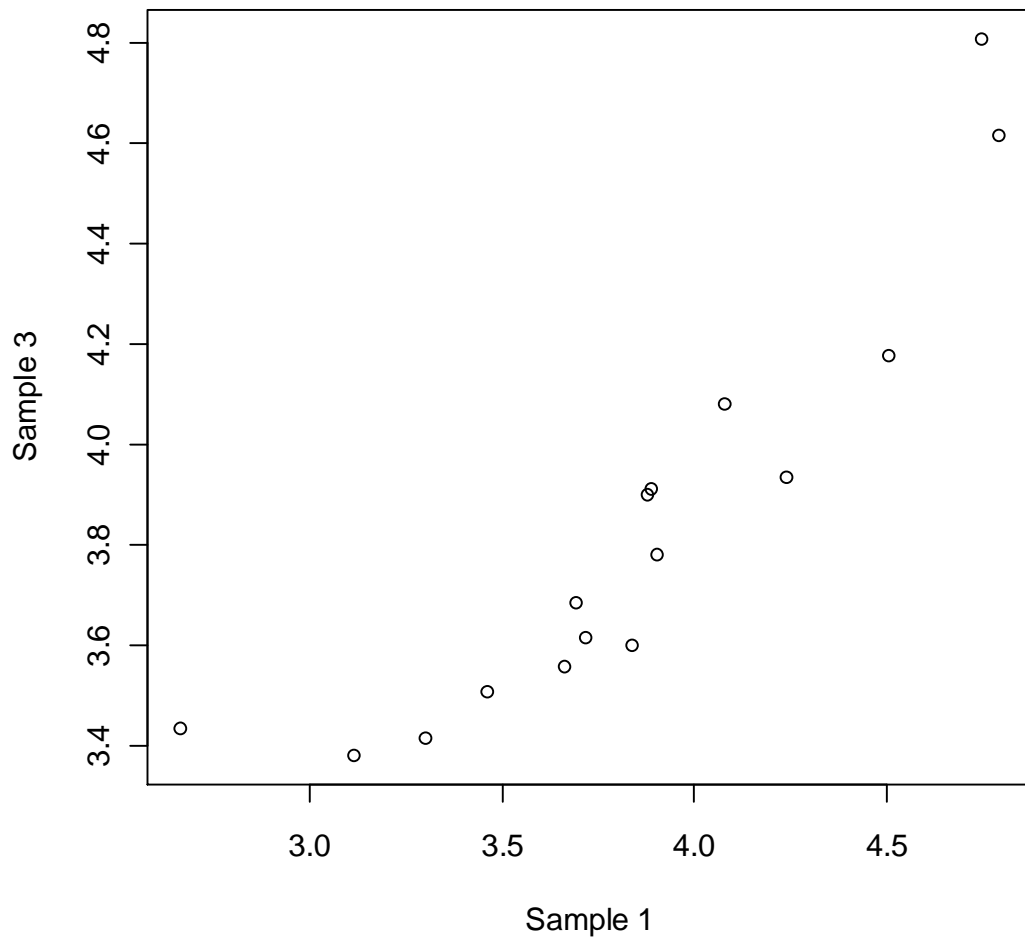
Graphique 1





Graphique 2

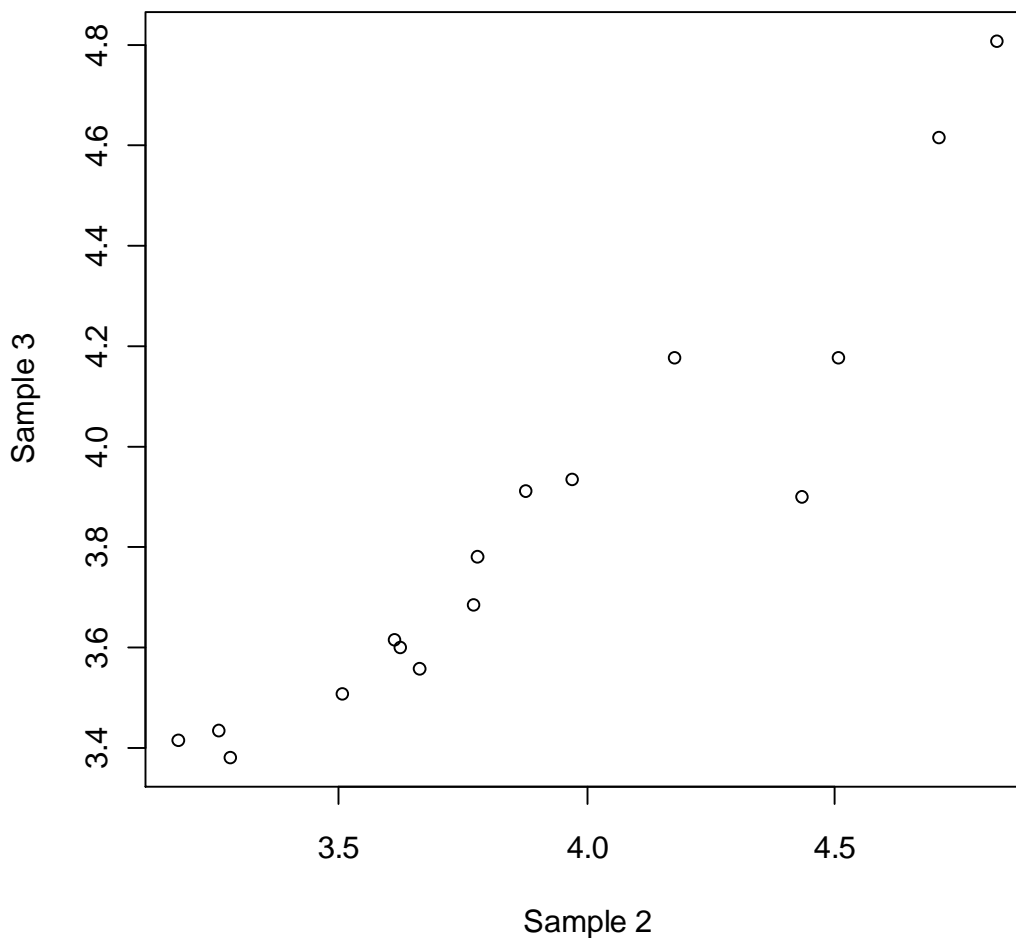
Pseudomonas spp (Log CFU/g)





Graphique 3

Pseudomonas spp (Log CFU/g)



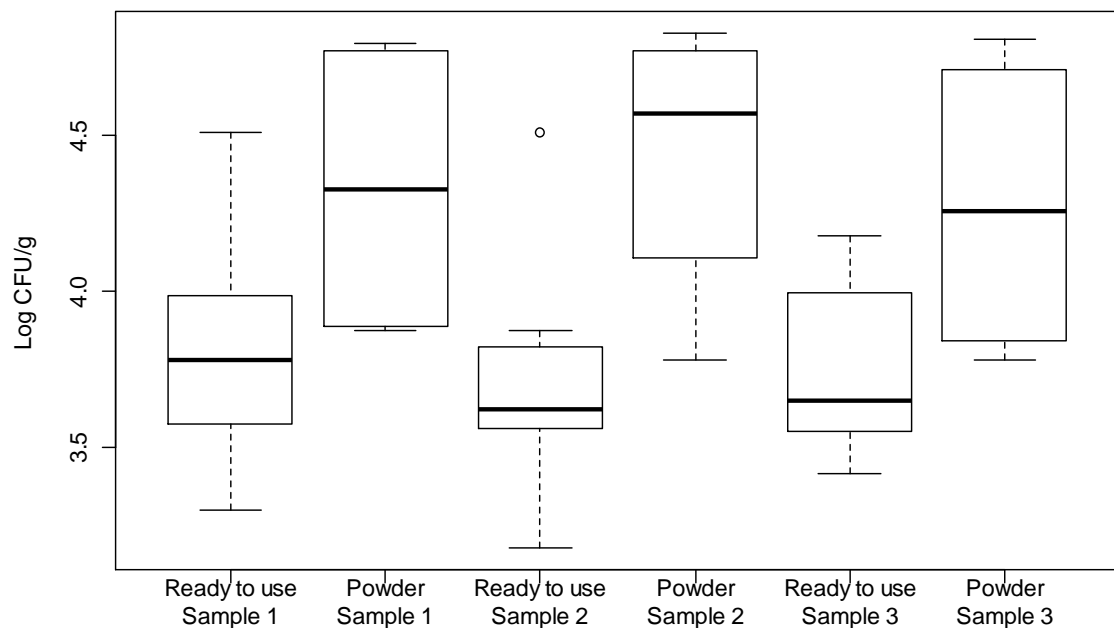
Les 3 graphiques montrent une direction claire de la distribution. L'écart-type élevé est donc lié à une dispersion des résultats entre les laboratoires et non à une hétérogénéité de l'échantillon.

- 2) Par contre, si on regarde les box-plots obtenus en comparant les résultats de 12 laboratoires (sur 17 participants) en fonction du type de milieu utilisé (Oxoid en poudre versus Oxoid prêt à l'emploi), nous remarquons que les laboratoires qui



utilisent un milieu en poudre ont tendance à obtenir des résultats plus élevés que les laboratoires qui utilisent un milieu prêt à l'emploi. Aussi, ces résultats ont tendance à être plus élevés que le niveau d'inoculation. Voir graphique 4.

Graphique 4.



Valeurs-p :

Echantillon 1: 0.07273

Echantillon 2: 0.04242

Echantillon 3: 0.01091

La différence est significative quand la valeur-p est inférieure à 0,05.

Ce n'est pas le cas pour tous les échantillons mais il y a quand-même une tendance à une différence liée au type de milieu car les valeurs-p se trouvent aux alentours de la limite de la significativité.

3) Hypothèse : le milieu en poudre de chez Oxoid permet à d'autres germes que *Pseudomonas spp.* de pousser sur le milieu. Les résultats plus élevés des



laboratoires utilisant un milieu en poudre seraient causés par la présence d'autres colonies que *Pseudomonas spp* (dont la flore naturelle du saumon) sur le milieu de dénombrement, entraînant une plus grande difficulté à dénombrer et confirmer les colonies si le nombre de dilutions effectuées n'est pas suffisant. Si la confirmation des colonies n'est pas correctement effectuée, le résultat peut être plus élevé qu'attendu.

8. Discussion et conclusions

L'analyse des résultats d'un essai d'aptitude ne repose pas uniquement sur les performances individuelles de chaque laboratoire. Nous l'avons remarqué avec la moyenne des écart-types des analyses de *Pseudomonas*. D'où l'importance de connaître la méthode d'analyse utilisée par chaque laboratoire.

L'échantillon n°4 était un échantillon blanc, naturellement contaminé, non contaminé artificiellement. Nous n'avons pas utilisé les résultats de cet échantillon.

Le rapport intermédiaire attaché au présent rapport diffère légèrement de celui envoyé en juillet au niveau de l'écart-type du dénombrement des bactéries lactiques de l'échantillon 1 mais cela n'a aucun impact sur le résultat des laboratoires.

Un rapport intermédiaire a été envoyé à chaque laboratoire en version électronique le 19 juillet 2012. Le rapport final est envoyé le fin octobre 2012 en version papier.

Le prochain essai d'aptitude sera organisé en juin 2013.