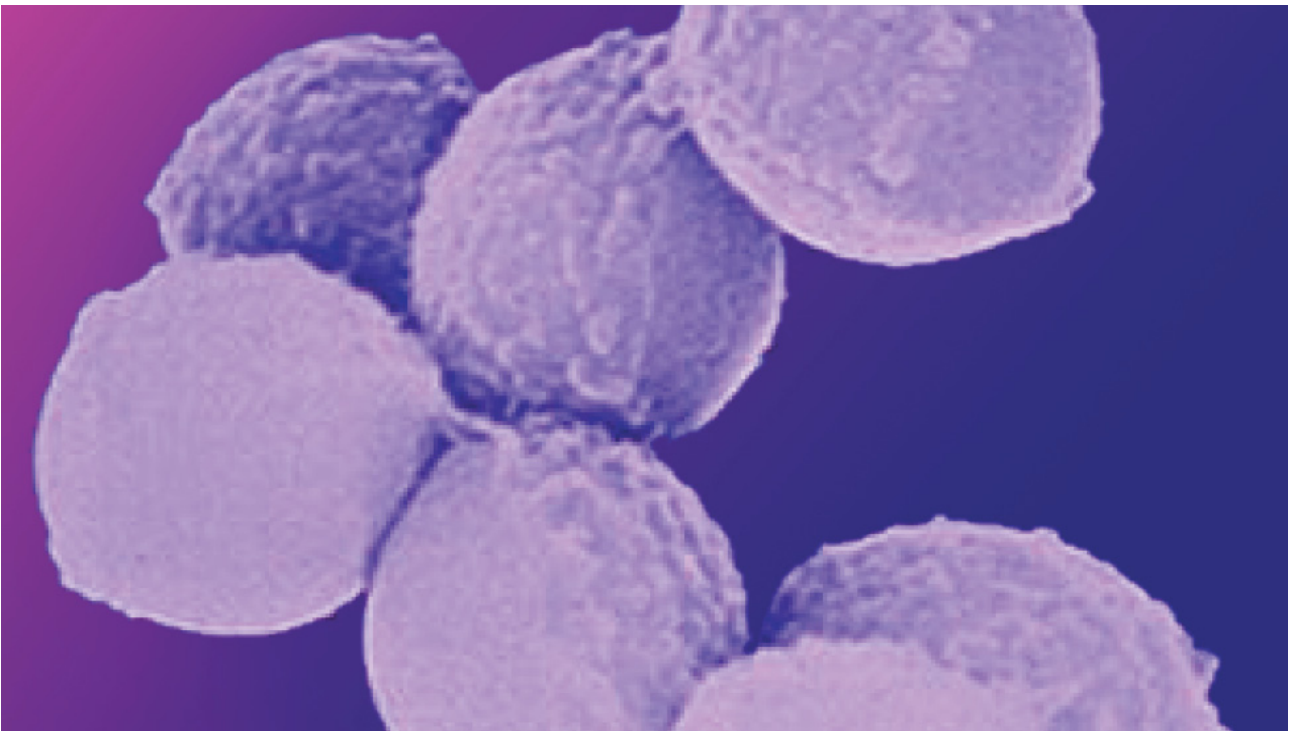


NACHWEIS UND ZÄHLUNG DER KOAGULASE-POSITIVEN STAPHYLOKOKKEN IN MILCH

Technisch-wissenschaftliche Informationen



Inhalt

1. Zusammenfassung	3
2. Experimenteller Teil	4
3. Resultate	5
4. Diskussion	10

ALP science
(vormals FAM Info)

Titelbild

Elektronenmikroskopische Aufnahme von Staphylokokken

Erstveröffentlichung

Autor

Marc Dalla Torre und Thomas Berger

Herausgeber

Agroscope Liebefeld-Posieux
Eidg. Forschungsanstalt
für Nutztiere und Milchwirtschaft (ALP)
Schwarzenburgstrasse 161
CH-3003 Bern
Telefon +41 (0)31 323 84 18
Fax +41 (0)31 323 82 27
http: www.alp.admin.ch
e-mail: science@alp.admin.ch

Kontakt Rückfragen

Marc Dalla Torre
e-mail marc.dalla-torre@alp.admin.ch
Telefon +41 (0)31 323 82 56
Fax +41 (0)31 322 86 16

Gestaltung

Helena Hemmi (Konzept), Müge Yildirim (Layout)

Erscheinung

Mehrmals jährlich in unregelmässiger Folge

ISBN 3-905667-16-9

ISSN 1660-7856 (online)

NACHWEIS UND ZÄHLUNG DER KOAGULASE-POSITIVEN STAPHYLOKOKKEN IN MILCH

Proficiency Testing 2003

Ergebnisse der statistischen Auswertung

1. Zusammenfassung

Es nahmen 17 Laboratorien aus 13 Betrieben am Proficiency Testing (PT) zum Nachweis und zur Zählung von koagulasepositiven Staphylokokken teil. Das PT ist erfolgreich verlaufen, obgleich die Ergebnisse insbesondere bei der Vergleichbarkeit R etwas schlechter als diejenigen vom PT 2001 und 2002 ausfielen (R: 065 -> 1.09 log KBE/mL, r: 0.42 -> log 0.38 KBE/mL). Dies könnte damit zusammenhängen, dass diesmal Rohmilch anstelle von pasteurisierter Milch als Matrix verwendet wurde. Ein Resultat wurde bei der Wiederholbarkeit r als Ausreisser identifiziert.

Jedem Labor wurden 5 Milchproben zugestellt, die als Doppelproben zu prüfen waren. Alle teilnehmenden Labors haben ihre Ergebnisse zurückgesandt.

Als gut wurden Ergebnisse bezeichnet, die nicht mehr als ± 0.30 log KBE/mL vom jeweiligen log des Mittelwerts (MW) aller Laboratorien abwichen. Etliche Ergebnisse wiesen deutlich höhere Abweichungen auf. Für die Wiederholbarkeit wurde ein Werte von 0.38 log KBE/mL und für die Vergleichbarkeit ein Wert von 1.09 log KBE/mL ermittelt.



Koagulasepositive Staphylokokken stammen oft aus dem Euter infizierter Tiere

2. Experimenteller Teil

2.1 Ziel und Problemstellung

Bereits zum 4. Mal wurde ein PT zum Nachweis und zur Zählung von koagulasepositiven Staphylokokken durchgeführt.

Ziel war die Überprüfung der Leistungsfähigkeit aller Labors.

2.2 Teilnehmende Labors

Am Proficiency Testing beteiligten sich 13 Betriebe mit 16 Labors. Die Namen der Laboratorien wurden den Teilnehmern in anonymisierter Form zugestellt.

2.3 Probenmaterial und Vorbereitung

Bei den mit den Nummern 1–5 gekennzeichneten fünf Milchproben, handelte es sich um mit koagulasepositiven Staphylokokken gespikete Rohmilch. Jede Probe enthielt eine andere Konzentration. Die koagulasepositiven Staphylokokken bestanden aus einem Gemisch von Wildstämmen, welche aus Weichkäsen isolierten wurden.

Die Proben mit den Nummern 1–5 wurden so vorbereitet, dass sie etwa nachfolgend aufgeführte Keimzahlen an koagulasepositiven Staphylokokken enthalten sollten.

Milchproben 1	ca. 400/mL
Milchproben 2	ca. 200/mL
Milchproben 3	ca. 2500/mL
Milchproben 4	ca. 5000/mL
Milchproben 5	ca. 4000/mL

Die gekühlte Milch (4°C) wurde am Vormittag vor dem Versuchstag mit den entsprechenden Konzentrationen an koagulasepositiven Staphylokokken inokuliert und anschließend gründlich durchmischt. Danach wurden ca. 10 mL der beimpften Milch in verschraubbare sterile Reagenzgläser pipettiert. Die Probenmenge ermöglichte eine doppelte Untersuchung der Proben.

2.4 Probentransport

Die Zustellung der Versandboxen erfolgte durch die Post. Den Boxen wurden zwei tiefgefrorene Kühlelemente beigegeben und am Vortag des Versuches, um 16 Uhr per A Post verschickt. Sie sind weitgehend rechtzeitig und gekühlt in den verschiedenen Laboratorien eingetroffen.

2.5 Untersuchungsmethoden

Den Laboratorien wurde empfohlen, die Untersuchung gemäss Methode E6, SLMB Kap. 56 (Ausg. 07/00), mit Baird Parker Agar unter Zugabe von Rabbit Plasma (BPA+RPF) durchzuführen.

2.6 Statistik

Die Proficiency-Testing Auswertung wurde mit der parametrischen Auswertung (ISO 5725), FAM RINGTEST Version 2.2, Januar 2000 durchgeführt.

2.6.1 Standardabweichung der Wiederholbarkeit (repeatability) s_r

Die Standardabweichung der Wiederholbarkeit s_r ist die mittlere Standardabweichung, die man erhält, wenn eine Probe am gleichen Tag, unter gleichen Bedingungen, von derselben Person mehrfach bestimmt wird; s_r ist somit ein durchschnittliches Mass für die Streuung, die man in einem Labor erhält. Die Standardabweichung s_r kann nur ermittelt werden, wenn eine Probe mindestens 2-fach angesetzt wird (bzw. 2 parallele Proben mit derselben Keimkonzentration). Sie wird mit zunehmender Anzahl Ansätze sicherer ermittelt. In den meisten Proficiency Testings arbeitet man nur mit Doppelbestimmungen. Mit dem Ringtestprogramm wurde nach Ausreissern bei der Wiederholbarkeit (COCHRAN-Test) gesucht.

2.6.2 Standardabweichung der Vergleichbarkeit (reproducibility) s_R

Die Standardabweichung der Vergleichbarkeit s_R ist die mittlere Standardabweichung zwischen den Laboratorien. Die Bestimmungen können von verschiedenen Personen, mit verschiedenen Geräten und verschiedenen Methoden, in verschiedenen Laboratorien, an unterschiedlichen Tagen durchgeführt werden. s_R ist somit ein durchschnittliches Mass für die Streuung der Ergebnisse zwischen verschiedenen Laboratorien.

Mit dem Ringtestprogramm wurde nach Ausreissern bei der Vergleichbarkeit (Grubbs-Test) gesucht.

3. Resultate

Die Labors wurden anonymisiert und mit Nummern versehen.

3.1 Verwendete Nährmedien und Inkubationsbedingungen

Labor Nr.	Baird Parker Medium Hersteller Bulk ware/Plasma	Inokulation und Inkubation der Petrischalen
1	Bio Mérieux / Bio Mérieux	Spatel, 2d 37°C
2	Bio Mérieux / Selbsthergestellt	Spatel, 2d 37°C
3	Oxoid/Selbsthergestellt/Fibrinogen SIGMA	Spatel, 2d 37°C
4	Oxoid	Spatel, keine Angabe
5	Oxoid/Oxoid	Spatel, 2d; 38°C
6	Bio Biolife Fertigplatten	Spatel, 2d; 37°C
7	Bio Biolife Fertigplatten	Spatel, 2d 37°C
8	Bio Biolife Fertigplatten	Spatel, 2d 37°C
9	Bio Biolife Fertigplatten	Spatel, 2d 37°C
10	Bio Biolife Fertigplatten	Spatel, 2d 37°C
11	Oxoid Fertigplatten	Spatel, 2d 37°C
12	Oxoid Fertigplatten Eigelb Tellurit	Spatel, 2d 37°C
13	Bio Mérieux /Bio Mérieux	Spatel, 2d 37°C
14	Keine Angabe	Spatel, 1d 37°C
15	Biolife/Bio Mérieux	Spatel, 2d 37°C
16	Difco/Oxoid	Spatel, 2d 37°C
17	Oxoid Fertigplatten	Spatel 1d 37°C

Tab. 1: Verwendete Medien

3.2 Auswertung

Die Resultate wurden in Anzahl koagulasepositiver Staphylokokken pro mL (KBE/mL) angegeben. Soweit möglich, wurden für die statistischen Berechnungen die beiden Werte der Parallelproben, welche im Bereich zwischen 10–150 Kolonien pro Platte lagen berücksichtigt. In wenigen Fällen wurden allerdings auch tiefere oder höhere Koloniezahlen in die Berechnungen einbezogen. In der Regel gelangten die Verdünnung –1 oder –2 in die Auswertung. Waren 3 oder gar 4 brauchbare Zahlen (zweier Verdünnungsstufen) vorhanden, wurden diese Zahlen ebenfalls alle in die Berechnungen einbezogen.

Für die Berechnung der Wiederholbarkeit werden pro Probe mindestens zwei Werte, wenn möglich der gleichen Verdünnung, benötigt. Wird nur ein Resultat pro Probe eingesandt, ist es nicht möglich die Wiederholbarkeit zu bestimmen.

Im Unterschied zum vorangehenden PT, wurde diesmal der normale und nicht der geometrische Mittelwert verwendet. Dies hat je nach Streuung der Werte einen nicht unerheblichen Einfluss auf die Abweichungen vom jeweiligen Mittelwert. Der geometrischen Mittelwert liegt teilweise deutlich tiefer als der «normale» Mittelwert.

Um eine bessere Annäherung an eine Normalverteilung zu erhalten, wurden die Keimzahlen in ihre logarithmische Form transformiert.

3.2.1 Mittelwerte der Doppelproben

Labor Nr.	Mittelwerte log KBE/mL				
	Milch 1	Milch 2	Milch 3	Milch 4	Milch 5
1	2.11	2.10	2.89	3.08	3.38
2	2.16	0.85	2.98	3.15	3.07
3	2.92	k.W.	3.57	4.07	3.85
4	2.69	2.96	3.80	4.13	3.94
5	2.32	0.84	3.25	2.94	3.87
6	3.04	2.30	3.57	3.97	k.W.
7	2.85	2.29	3.73	3.88	3.48
8	2.58	2.21	3.56	3.87	3.69
9	2.75	2.33	3.63	3.67	3.65
10	2.24	2.39	3.28	3.64	3.26
11	2.46	2.45	3.45	3.66	3.76
12	2.46	2.35	3.38	3.53	3.51
13	2.13	1.65	3.07	3.31	3.39
14	2.54	1.76	2.71	2.94	3.28
15	2.32	2.57	3.35	3.49	3.49
16	2.52	2.41	3.60	3.60	3.48
17	2.55	1.06	3.20	3.61	3.58
MW	2.51	2.20	3.33	3.55	3.55

k.W.: kein Wert
* nur ein Wert vorhanden

Tab. 2: Ergebnisse der Keimzahlbestimmungen

3.2.2 Standardabweichungen der Doppelproben

Labor Nr.	Standardabweichungen der Doppelproben log KBE/mL				
	Milch 1	Milch 2	Milch 3	Milch 4	Milch 5
1	0.05	0.21	0.27	0.14	0.11
2	0.06	0.21	0.01	0.04	0.23
3	0.02	k.W.	0.09	0.10	0.02
4	0.08	0.03	0.06	0.02	0.02
5	0.06	0.09	0.03	0.14	0.34
6	0.05	0.06	0.05	0.06	k.W.
7	0.17	0.20	0.27	.	**0.68
8	0.12	0.13	0.04	0.01	0.20
9	0.09	0.07	0.23	0.27	0.05
10	0.28	0.12	0.05	0.04	0.27
11	0.04	0.10	0.10	0.10	0.10
12	0.17	0.07	0.03	0.07	0.09
13	0.18	0.07	0.16	0.01	0.12
14	0.03	0.40	0.02	0.17	0.14
15	0.09	0.07	0.01	0.00	0.13
16
17	0.14	0.03	0.05	0.03	0.11

k.W.: kein Wert * nur ein Wert vorhanden ** Ausreisser

Tab. 3: Standardabweichungen der Doppelproben (log MW)

3.2.3 Abweichungen zum Mittelwert

Labor Nr.	log KBE/mL				
	Milch 1	Milch 2	Milch 3	Milch 4	Milch 5
1	-0.39	0.07	-0.46	-0.48	-0.16
2	-0.35	-1.18	-0.38	-0.42	-0.47
3	0.41	k.W.	0.22	0.51	0.31
4	0.18	0.93	0.44	0.57	0.40
5	-0.19	-1.19	-0.10	-0.62	0.32
6	0.53	0.27	0.21	0.41	k.W.
7	0.34	0.26	0.38	0.31	-0.06
8	0.07	0.17	0.21	0.31	0.14
9	0.24	0.30	0.27	0.11	0.11
10	-0.27	0.36	-0.08	0.08	-0.29
11	-0.05	0.42	0.10	0.10	0.22
12	-0.05	0.32	0.03	-0.03	-0.03
13	-0.38	-0.38	-0.29	-0.25	-0.15
14	0.03	-0.27	-0.64	-0.62	-0.26
15	-0.19	0.53	0.00	-0.07	-0.05
16	0.01	0.38	0.25	0.04	-0.06
17	0.04	-0.97	-0.16	0.05	0.04

k.W.: kein Wert

Tab. 4: Abweichungen des Labormittelwertes vom Gesamtmittelwert

3.3 Toleranzen

Ergebnisse, welche weniger als 0.30 log vom ausreisserbereinigten Mittelwert aller Laboratorien abweichen, gelten als gut. Dasselbe gilt auch für die Streuung (+/- 0.30 log). Dies entspricht auch der Beurteilung welche von CECALAIT, Poligny (F) angewandt wird.

3.4 Rankinglist der Laboratorien, Abweichungen zum Mittelwert

Milch 1		Milch 2		Milch 3		Milch 4		Milch 5		Milch 1 - 5	
Lab. Nr.	log KBE/mL	Lab. Nr.	log KBE/mL	Lab. Nr.	log KBE/mL	Lab. Nr.	log KBE/mL	Lab. Nr.	log KBE/mL	Lab. Nr.	log KBE/mL
16	0.01	18	0.00	15	0.00	12	0.03	12	0.03	12	0.09
14	0.03	1	0.07	12	0.03	16	0.04	17	0.04	16	0.15
17	0.04	8	0.17	10	0.08	17	0.05	15	0.05	15	0.17
11	0.05	7	0.26	11	0.10	15	0.07	7	0.06	11	0.18
12	0.05	6	0.27	5	0.10	10	0.08	16	0.06	8	0.18
8	0.07	14	0.27	17	0.16	11	0.10	9	0.11	9	0.21
4	0.18	9	0.30	8	0.21	9	0.11	8	0.14	10	0.22
5	0.19	12	0.32	6	0.21	13	0.25	13	0.15	17	0.25
15	0.19	10	0.36	3	0.22	8	0.31	1	0.16	7	0.27
9	0.24	13	0.38	16	0.25	7	0.31	11	0.22	13	0.29
10	0.27	16	0.38	9	0.27	6	0.41	14	0.26	1	0.31
7	0.34	11	0.42	13	0.29	2	0.42	10	0.29	6	0.36
2	0.35	15	0.53	2	0.38	1	0.48	3	0.31	3	0.36
13	0.38	4	0.93	7	0.38	3	0.51	5	0.32	14	0.36
1	0.39	17	0.97	4	0.44	4	0.57	4	0.40	5	0.48
3	0.41	2	1.18	1	0.46	5	0.62	2	0.47	4	0.50
6	0.53	5	1.19	14	0.64	14	0.62			2	0.56

Tab. 5

Tab. 6

Tab. 7

Tab. 8

Tab. 9

Tab. 10

3.5 Eckdaten der Wiederholbarkeit und der Vergleichbarkeit

Eckdaten (Werte in log KBE/mL)	Milch 1	Milch 2	Milch 3	Milch 4	Milch 5	Milch 1 – 5 MW
Mittelwert MW	2.51	2.20	3.33	3.55	3.55	
Standardabweichung der Wiederholbarkeit s_r	0.12	0.16	0.13	0.11	0.16	0.14
Wiederholbarkeit r	0.35	0.44	0.36	0.31	0.46	0.38
Standardabweichung der Vergleichbarkeit s_R	0.30	0.65	0.92	0.38	0.28	0.51
Vergleichbarkeit R	0.84	1.83	0.92	1.09	0.79	1.09

Tab. 11a: Eckdaten der Wiederholbarkeit r und der Vergleichbarkeit R für 2003

Eckdaten (ohne Lab. 4) (Werte in log KBE/mL)	Milch 1	Milch 2	Milch 3	Milch 4	Milch 5	Milch 1 – 5 MW
Geometrischer Mittelwert GMW	1.81	3.05	2.86	1.26	1.88	2.17
Standardabweichung der Wiederholbarkeit s_r	0.18	0.09	0.07	0.28	0.13	0.15
Wiederholbarkeit r	0.52	0.25	0.19	0.78	0.36	0.42
Standardabweichung der Vergleichbarkeit s_R	0.23	0.20	0.15	0.37	0.21	0.23
Vergleichbarkeit R	0.64	0.57	0.41	1.04	0.60	0.65

Tab. 11b: Eckdaten der Wiederholbarkeit r und der Vergleichbarkeit R für 2002

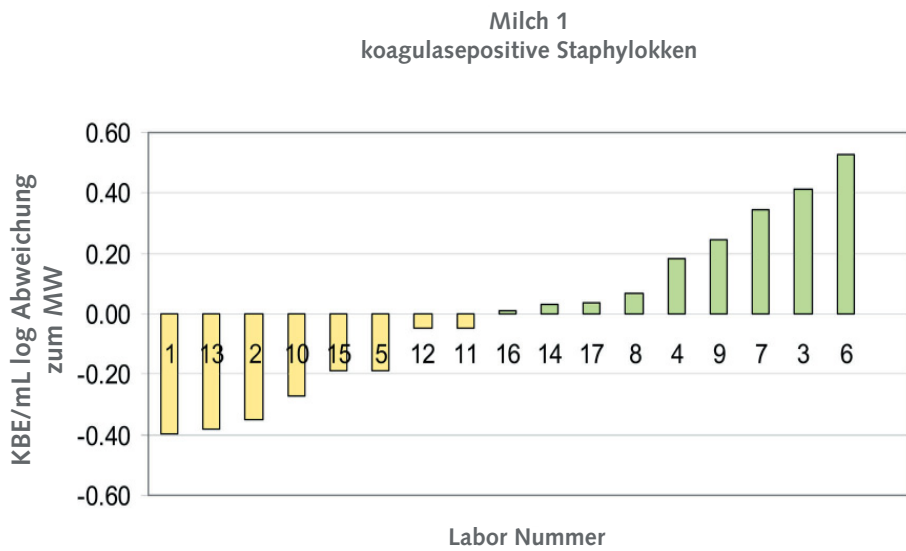


Abb. 1: Graphische Darstellung der Abweichungen zum Mittelwert für Milch 1

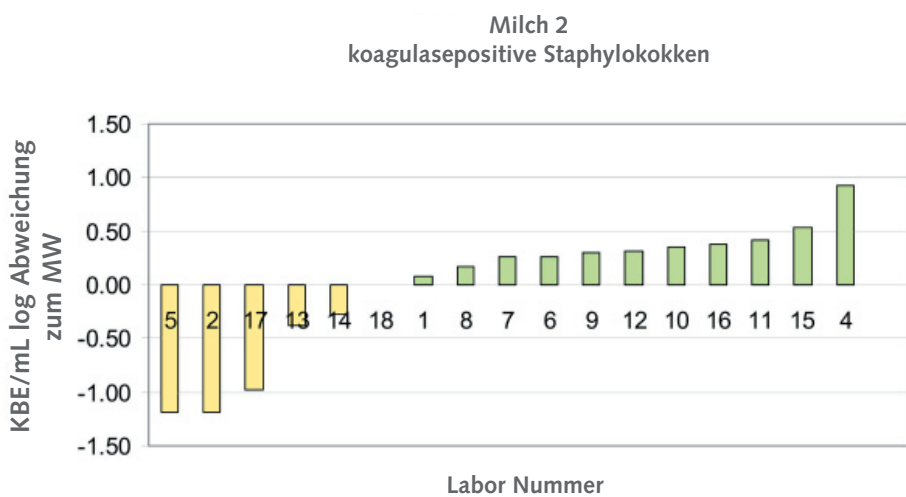


Abb. 2: Graphische Darstellung der Abweichungen zum Mittelwert für Milch 2

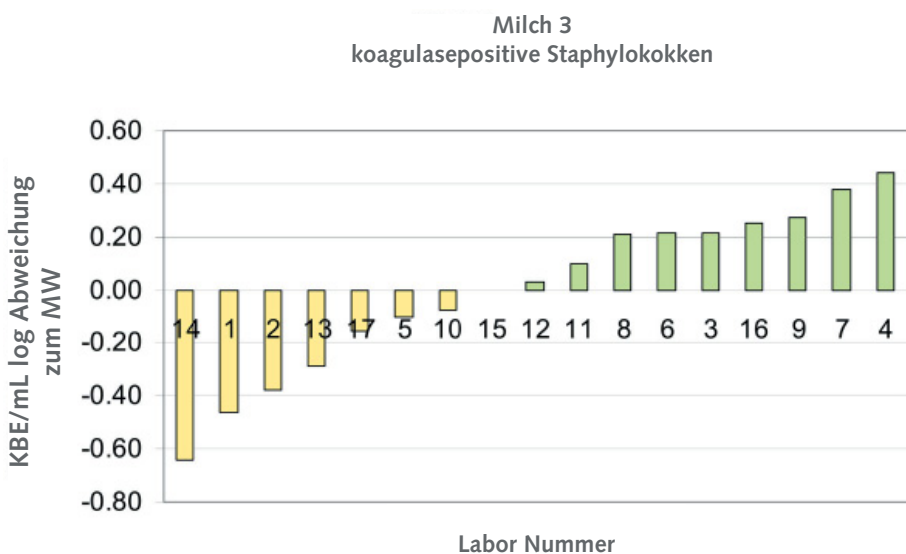


Abb. 3: Graphische Darstellung der Abweichungen zum Mittelwert für Milch 3

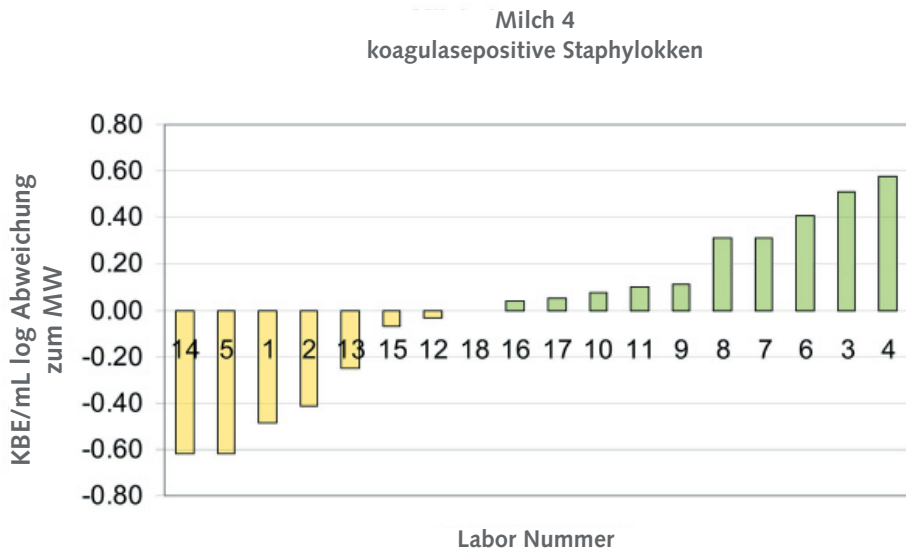


Abb. 4: Graphische Darstellung der Abweichungen zum Mittelwert für Milch 4

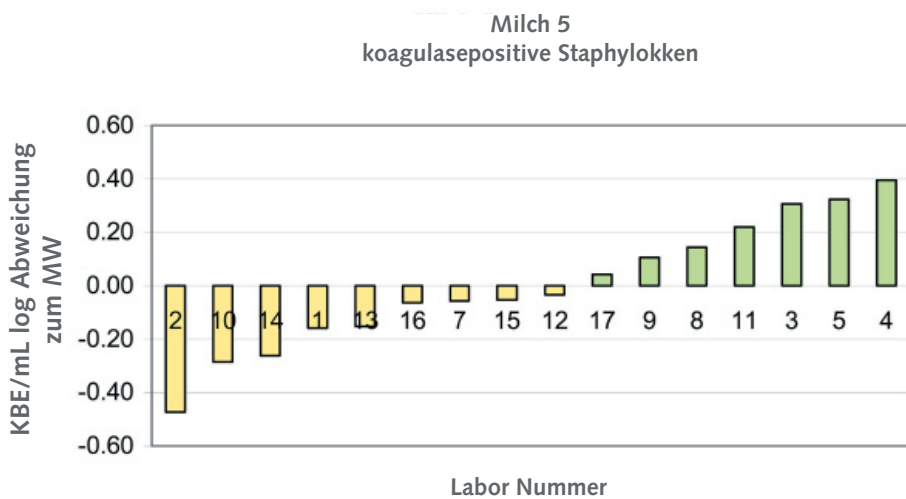


Abb. 5: Graphische Darstellung der Abweichungen zum Mittelwert für Milch 5

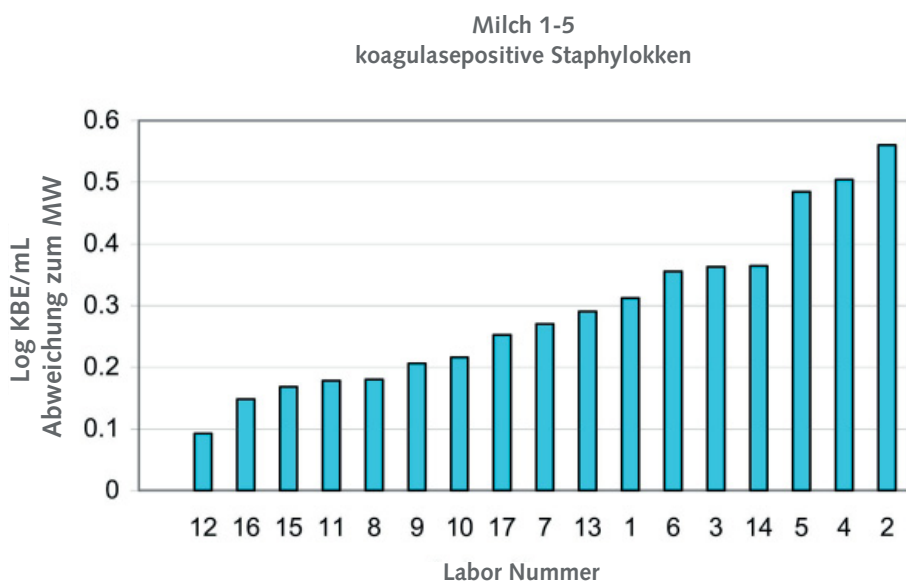


Abb. 6: Graphische Darstellung der Abweichungen zum Mittelwert für Milch 1 bis 5

4. Diskussion

Generell lagen die Keimzahlwerte im erwarteten Bereich (siehe Tab. 5–10 und 12).

Die Ergebnisse der Doppelproben sind recht gut. Die Ergebnisse liegen so, dass wir bei fast allen Milchproben die Standardabweichung der Wiederholbarkeit s_r ermitteln konnten. Ein einziges Labor weist einen Ausreisser nach COCHRAN auf (Labor 7 bei der Milch 5).

Zwei Labors inkubieren nur während 1 Tag. Dies scheint keinen signifikanten Einfluss auf die Ergebnisse zu haben.

Die Streuung der Ergebnisse zwischen den einzelnen Labors ist recht hoch. Da aber nie ausschliesslich die Ergebnisse eines einzelnen Labors von den Ergebnissen der anderen abweicht, lässt sich statistisch auch kein Ausreisser nach Grubbs finden. Die recht grosse Streuung weist u.a. aber darauf hin, dass die Methode zum Nachweis von koagulasepositiven Staphylokokken mehr Schwierigkeiten und Tücken aufweist, als vergleichbare Methoden zum Nachweis anderer üblicher Hygiene- und potentiell pathogener Keime.

Die grosse Streuung der Werte ist am deutlichsten bei der Milch 2 zu erkennen (Siehe auch Tab. im Anhang).

Die mittlere Abweichung aller fünf Proben liegt bei knapp der Hälfte der Labors über 0.30 log KBE/mL (siehe Tab. 10 und Abb. 6). Besonders aus der Tabelle 4 und 5 bis 9 geht hervor, dass bei den Labors 1, 2, 7 und 13 eine systematische Abweichung vorliegt, liegen sie doch mit den meisten ihrer Werte eher zu tief.

- Milch 1: Die Ergebnisse der Laboratorien 16, 14, 17, 11 und 12, liegen sehr nahe am Mittelwert. Am weitesten entfernt liegen die Ergebnisse von Labor 6.
- Milch 2: Die Ergebnisse der Laboratorien 18 und 1 liegen beim oder sehr nahe am Mittelwert. Am weitesten entfernt liegen die Ergebnisse von Labor 17, 2 und 5.
- Milch 3: Die Ergebnisse der Laboratorien 15, 12 und 10 liegen sehr nahe am Mittelwert. Am weitesten entfernt liegen die Ergebnisse von Labor 14.
- Milch 4: Die Ergebnisse der Laboratorien 12, 16, 17 und 15 liegen sehr nahe am Mittelwert. Am weitesten entfernt liegen die Ergebnisse von Labor 5 und 14.
- Milch 5: Die Ergebnisse der Laboratorien 12, 17, 15, 7 und 16 liegen sehr nahe am Mittelwert. Am weitesten entfernt liegen die Ergebnisse von Labor 2.

Anhang

Lab.		Milch 1	Milch 2	Milch 3	Milch 4	Milch 5
1	1. Wert	120	90	1200	950	2000
	2. Wert	140	180	500	1500	2900
2	1. Wert	130	10	970	1500	1700
	2. Wert	160	5	930	1300	800
3	1. Wert	860	k.W.	3200	13700	7300
	2. Wert	800	k.W.	4300	10000	6800
4	1. Wert	560	970	6900	14200	8300
	2. Wert	430	870	5700	13100	9000
5	1. Wert	230	6	1690	1100	12800
	2. Wert	190	8	1890	700	4200
6	1. Wert	1000	220	4000	10200	k.W.
	2. Wert	1180	180	3400	8400	k.W.
7	1. Wert	930	270	8300	7500	1000
	2. Wert	540	140	3500	k.W.	9300
8	1. Wert	310	130	3900	7300	3500
	2. Wert	460	200	3400	7600	6700
9	1. Wert	650	190	2900	3000	4800
	2. Wert	490	240	6200	7300	4100
10	1. Wert	270	300	2065	4600	2800
	2. Wert	110	200	1735	4100	1160
11	1. Wert	310	240	3300	3900	4900
	2. Wert	270	330	2400	5400	6800
12	1. Wert	380	250	2300	3000	3700
	2. Wert	220	200	2510	3800	2800
13	1. Wert	180	40	1500	2100	2000
	2. Wert	100	50	900	2000	3000
14	1. Wert	330	110	530	660	2400
	2. Wert	360	30	500	1160	1500
15	1. Wert	180	340	2200	3100	3800
	2. Wert	240	410	2275	3100	2500
16	1. Wert	330	260	4000	4000	3000
	2. Wert	k.W.	k.W.	k.W.	k.W.	k.W.
17	1. Wert	440	11	1695	4300	4300
	2. Wert	280	12	1460	3900	3400
MW		399	209	2795	4952	4299

k.W.: kein Wert

Tab. 12: Rohdaten (KBE/mL koagulasepositiver Staphylokokken pro Petrischale)