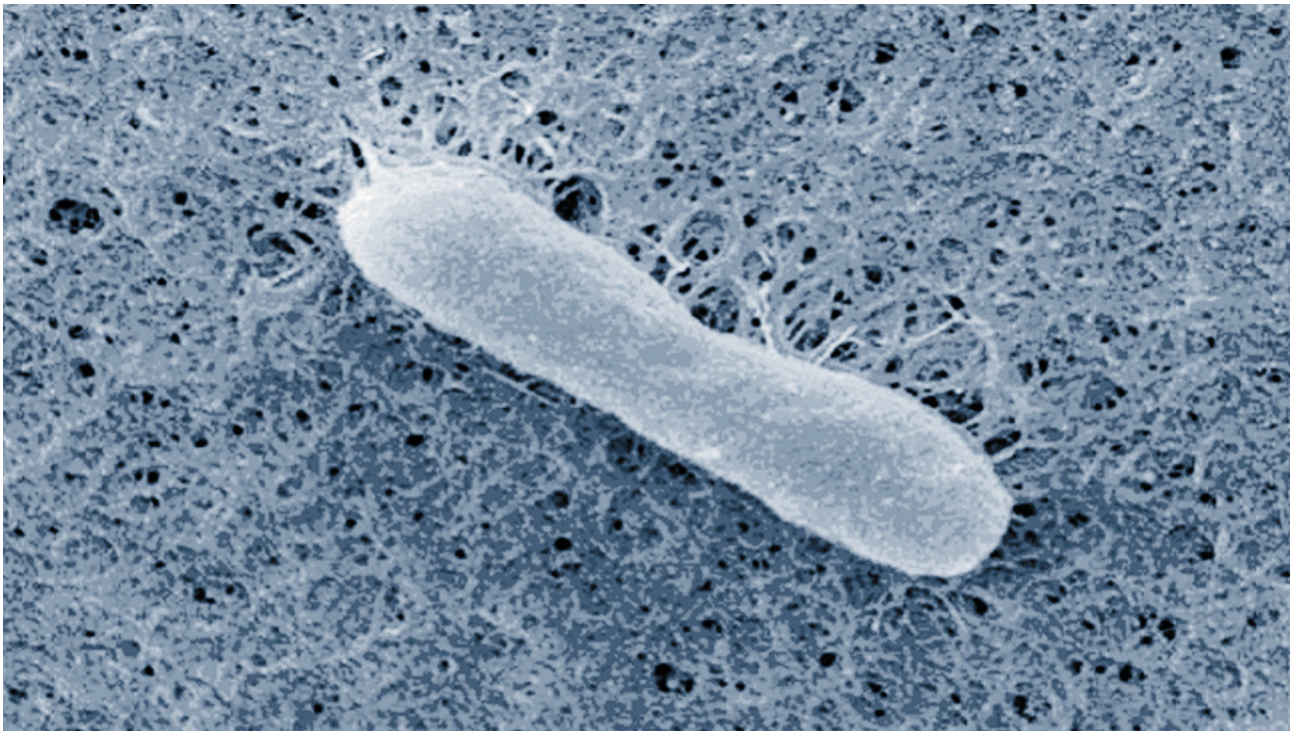


NACHWEIS UND ZÄHLUNG DER E.COLI-BAKTERIEN IN MILCH

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 einer *E.coli*-Zelle

Erstveröffentlichung

Autoren

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 3-905667-15-0

ISSN 1660-7856 (online)

NACHWEIS UND ZÄHLUNG DER *E. COLI*-BAKTERIEN IN MILCH

Proficiency Testing 2003

Ergebnisse der statistischen Auswertung

1. Zusammenfassung

Letztmals wurde 1992 und 2000 von uns ein Proficiency Testing (PT) zum Nachweis von *E. coli* in Milch durchgeführt. In der Zwischenzeit haben alle Labs vom MUG-Agar auf einen chromogenen Agar umgestellt.

Diesmal nahmen 18 Laboratorien aus 14 Betrieben am PT teil. Es wurde die Wiederholbarkeit r ermittelt, der Schwerpunkt des PT's lag jedoch bei der Ermittlung der Vergleichbarkeit R . Die Ergebnisse sind deutlich besser als diejenigen vom PT 2000 (r : 0.61 \rightarrow 0.17 log KBE/mL, R : 078 \rightarrow 0.45 log KBE/mL).

Jedem Labor wurden 5 Milchproben zugestellt, die als Doppelproben zu prüfen waren. Als gut wurden die Ergebnisse bezeichnet, die nicht mehr als ± 0.30 log KBE/mL vom jeweiligen ausreisserbereinigten log des Mittelwerts (MW) aller Laboratorien abwichen.

Mit wenigen Ausnahmen haben sämtliche Labs diesem Kriterium entsprochen. Ein Labor lag mit seinen Werten etwas zu tief und wurde statistisch als Ausreisser identifiziert. Ein Labor wies eine etwas zu grosse Streuung der Werte auf. Für die Wiederholbarkeit r wurde ein Wert von 0.17 log KBE/mL und für die Vergleichbarkeit R ein Wert von 0.45 log KBE/mL ermittelt.

Bei keinem Labor wies der Mittelwert der 5 Proben eine grössere Distanz als log 0.30 zum Mittelwert der Ergebnisse aller Labs auf, was als sehr gut zu bezeichnen ist.



Andrea Oberli
beim Herstellen der
Verdünnungsreihe

2. Experimenteller Teil

2.1 Ziel und Problemstellung

Erstmals seit 2000 wurde wieder ein PT zum Nachweis und zur Zählung von *E.coli* durchgeführt.

Ziel des PT's war die Überprüfung der Leistungsfähigkeit der teilnehmenden Labors.

2.2 Teilnehmende Labors

Am Proficiency Testing beteiligten sich 14 Betriebe mit 18 Laboratorien. Die Namen der Laboratorien wurden den Teilnehmern in anonymisierter Form zugestellt.

2.3 Probenmaterial und Vorbereitung

Jedes Labor erhielt 5 Milchproben, gekennzeichnet mit den Nummern 1 bis 5. Die Pastmilchproben wurden mit *E.coli* gespiked. Jede Probe enthielt eine andere Konzentration. Die *E.coli*-Stämme bestanden aus einem Gemisch von Stämmen isoliert aus Weichkäsen und aus unserem Laborstamm *E.coli* ATCC 8739.

Die Proben mit den Nummern 1 bis 5 wurden so vorbereitet, dass sie etwa nachfolgend aufgeführte Keimzahlen an *E.coli* enthalten sollten:

Milchprobe 1	ca. 100'000/mL
Milchprobe 2	ca. 12'000/mL
Milchprobe 3	ca. 6'000/mL
Milchprobe 4	ca. 2'000/mL
Milchprobe 5	ca. 1'000/mL

Die gekühlte Milch (4 °C) wurde am Vormittag vor dem Versuchstag mit den entsprechenden Konzentrationen an *E.coli* 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 ein bis zwei tiefgefrorene Kühlelemente beigegeben und am Vortag des Versuches um 16 Uhr mittels A Post verschickt. Sie sind weitgehend rechtzeitig und gekühlt in den verschiedenen Laboratorien eingetroffen.

2.5 Untersuchungsmethoden

Den Laboratorien wurde empfohlen, die Untersuchungen nach der SLMB-Methode durchzuführen.

2.6 Statistik

Das Proficiency Testing 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 der gleichen 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 (COCHRAN-Test) wurde bei der Wiederholbarkeit nach Ausreissern 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/Methode	Medienlieferant	Inkubation
1: Guss	Oxoid	1 d; 44°C
2: Guss	Biolife	1 d; 42°C
3: Guss	Oxoid (TBX)	1 d; 44°C
4: Guss	Oxoid (TBX)	1 d; 44°C
5: Guss	Biolife	1 d; 42°C
6: Guss	Biolife	1 d; 42°C
7: Guss	Biolife	1 d; 42°C
8: Spatel	Biolife	1 d; 37°C
9: Guss	Oxoid	1 d; 44°C
10: Guss	Oxoid	1 d; 44°C
11: keine Angabe	Merck Chromokult	1 d; 38°C
12: Guss	Biolife	1 d; 37°C
13: Guss	Bio Chromogen	1 d; 44°C
14: Spatel	Bio Mérieux	1 d; 37°C
15: Guss	Bio Mérieux	1 d; 37°C
16: Guss	Bio Mérieux	1 d; 37°C
17: Guss	Bio Mérieux	1 d; 37°C
18: Spatel	Oxoid	1 d; 45°C

Tab. 1: Verwendete Medien

3.2 Auswertung

Die Resultate wurden in Anzahl *E.coli* pro mL (KBE/mL) angegeben. Für die statistischen Berechnungen wurden in der Regel die beiden Werte der Parallelproben, welche aus den Verdünnungen 10⁻² resultierten, berücksichtigt. Werte zwischen 20 bis 300 Kolonien pro Platte wurden bevorzugt. Wo dies nicht möglich war, wurden auch tiefere Werte in die Berechnungen einbezogen.

Labor 13 hat nur ein Resultat pro Probe eingesandt. Hier war es nicht möglich, die Wiederholbarkeit zu ermitteln. In einzelnen Fällen, wo nur ein Wert pro Verdünnung vorlag, wurde, um doch die Wiederholbarkeit *r* zu ermitteln, noch ein zweiter Wert aus der nächst höheren oder tieferen Verdünnung mitberücksichtigt. Dieses Vorgehen entspricht allerdings nicht den statistischen Regeln.

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	5.04	4.10	3.82	3.20	3.02
2	5.23	4.34	4.09	3.38	k.W.
3	***	4.14	3.72	3.31	2.92
4	4.97	k.W.	3.98	3.31	3.38
5	4.74	3.80	3.65	3.19	2.92
6	4.81	3.92	3.63	3.19	2.87
7	4.79	3.99	3.59	3.26	3.26
8	5.08	4.08	3.73	3.35	3.06
9	5.21	4.33	4.06	3.45	3.26
10	4.64*	4.08	3.84	3.27	3.11
11	5.09	3.88	4.09	2.99	2.83
12	4.76*	3.89*	3.70*	3.20*	2.99*
13	4.90	4.15	3.85	3.23	2.85
14	4.81	4.06	3.72	3.15	2.91
15	5.03	4.17	3.84	3.30	3.09
16	5.02	4.15	4.00	3.43	3.09
17	5.01	4.04	3.80	3.26	3.02
18	5.06	3.98	3.71	3.12	2.97
MW	4.95	4.06	3.81	3.26	3.04

k.W.: kein Wert

* nur ein Wert vorhanden

** Ausreisser bezüglich Standardabweichung der Doppelproben (Wiederholbarkeit)

*** Ausreisser bezüglich Standardabweichung aller Proben (Vergleichbarkeit)

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	0.14	0.09	0.08	0.05	0.06
2	0.05	0.03	0.00	0.03	k.W.
3	0.16	0.02	0.05	0.02	0.01
4	0.09	k.W.	0.03	0.02	0.03
5	0.02	0.00	0.08	0.01	0.00
6	0.08	0.02	0.18	0.00	0.03
7	0.04	0.05	0.05	0.00	0.02
8	0.05	0.04	0.01	0.14	0.03
9	0.03	0.06	0.01	0.05	0.02
10	0.23	0.05	0.03	0.03	0.01
11	*	0.06	0.03	0.03	0.05
12	0.03	0.00	0.05	0.04	0.03
14	0.02	0.01	0.05	0.13	0.02
15	0.07	0.02	0.03	0.05	0.02
16	0.02	0.05	0.06	0.09	0.03
17	0.04	0.01	0.03	0.08	0.00
18	0.01	0.06	0.18	0.19	0.20
MW	0.23	0.04	0.10	0.06	0.04

k.W.: kein Wert

* nur ein Wert vorhanden

Tab. 3: Standardabweichungen der Doppelproben (log MW)

3.2.3 Abweichungen zum Mittelwert

Labor Nr.	log KBE				
	Milch 1	Milch 2	Milch 3	Milch 4	Milch 5
1	0.13	0.04	0.01	-0.06	-0.02
2	0.32	0.28	0.28	0.12	k.W.
3	-0.84	0.08	-0.09	0.06	-0.11
4	0.07	k.W.	0.16	0.05	0.35
5	-0.16	-0.26	-0.17	-0.06	-0.11
6	-0.10	-0.14	-0.18	-0.06	-0.16
7	-0.11	-0.07	-0.22	0.01	0.23
8	0.17	0.02	-0.08	0.09	0.03
9	0.31	0.27	0.25	0.20	0.23
10	-0.26	0.02	0.03	0.02	0.08
11	0.19	-0.18	0.27	-0.27	-0.20
12	-0.15	-0.18	-0.11	-0.05	-0.04
13	0.00	0.08	0.03	-0.03	-0.18
14	-0.09	0.00	-0.09	-0.10	-0.12
15	0.12	0.11	0.02	0.04	0.06
16	0.12	0.08	0.18	0.17	0.06
17	0.10	-0.03	-0.02	0.00	-0.01
18	0.16	-0.08	-0.11	-0.13	-0.06

Tab. 4: Abweichung des Labormittelwertes zum Gesamtmittelwert (ausreisserbereinigt)

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 dem Vorgehen von CECALAIT, Poligny (F).

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	Lab. Nr.	log KBE	Lab. Nr.	log KBE	Lab. Nr.	log KBE	Lab. Nr.	log KBE	Lab. Nr.	log KBE
13	0.00	14	0.00	1	0.01	17	0.00	17	0.01	17	0.03
4	0.07	10	0.02	17	0.02	7	0.01	1	0.02	1	0.05
14	0.09	8	0.02	15	0.02	10	0.02	8	0.03	13	0.06
6	0.10	17	0.03	10	0.03	13	0.03	12	0.04	15	0.07
17	0.10	1	0.04	13	0.03	15	0.04	15	0.06	8	0.08
7	0.11	7	0.07	8	0.08	12	0.05	16	0.06	14	0.08
16	0.12	3	0.08	3	0.09	4	0.05	18	0.06	10	0.08
15	0.12	18	0.08	14	0.09	3	0.06	10	0.08	12	0.11
1	0.13	13	0.08	18	0.11	1	0.06	5	0.11	18	0.11
12	0.15	16	0.08	12	0.11	6	0.06	3	0.11	16	0.12
5	0.16	15	0.11	4	0.16	5	0.06	14	0.12	6	0.13
18	0.16	6	0.14	5	0.17	8	0.09	6	0.16	7	0.13
8	0.17	12	0.18	6	0.18	14	0.10	13	0.18	5	0.15
11	0.19	11	0.18	16	0.18	2	0.12	11	0.20	4	0.16
10	0.26	5	0.26	7	0.22	18	0.13	9	0.23	11	0.22
9	0.31	9	0.27	9	0.25	16	0.17	7	0.23	3	0.24
2	0.32	2	0.28	11	0.27	9	0.20	4	0.35	2	0.24
3	0.84					11	0.27			9	0.25

Tab. 5

Tab. 6

Tab. 7

Tab. 8

Tab. 9

Tab. 10

3.5 Ausreisserbereinigte Eckdaten der Wiederholbarkeit und der Vergleichbarkeit (Vergleich 2003 mit 2000)

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

PT 2003 Eckdaten (Werte in log KBE/mL)	Milch 1	Milch 2	Milch 3	Milch 4	Milch 5	Milch 1 – 5 MW
Anzahl Labors n	17	17	18	18	16	
Mittelwert MW	4.95	4.06	3.81	3.26	3.04	
Standardabweichung der Wiederholbarkeit s_r	0.08	0.04	0.08	0.08	0.03	0.06
Wiederholbarkeit r	0.24	0.12	0.22	0.23	0.08	0.17
Standardabweichung der Vergleichbarkeit s_R	0.18	0.15	0.18	0.13	0.16	0.16
Vergleichbarkeit R	0.52	0.43	0.47	0.36	0.45	0.45
Präzision R/r	2.20	3.49	2.16	1.65	5.54	

Tab. 11b: Eckdaten der Wiederholbarkeit r und der Vergleichbarkeit R für 2000

PT 2000 Eckdaten (Werte in log KBE/mL)	Milch A	Milch B	Milch C	Milch D	Milch E	Milch A-E MW
Anzahl Labors n	18	17	17	18	19	
Mittelwert MW	3.02	2.50	2.06	1.34	0.97	
Standardabweichung der Wiederholbarkeit s_r	0.06	0.09	0.16	0.45	0.30	0.21
Wiederholbarkeit r	0.17	0.27	0.44	1.27	0.84	0.61
Standardabweichung der Vergleichbarkeit s_R	0.15	0.26	0.17	0.45	0.35	0.28
Vergleichbarkeit R	0.42	0.74	0.47	1.27	0.99	0.78
Präzision R/r	2.42	2.96	1.57	1.00	1.00	

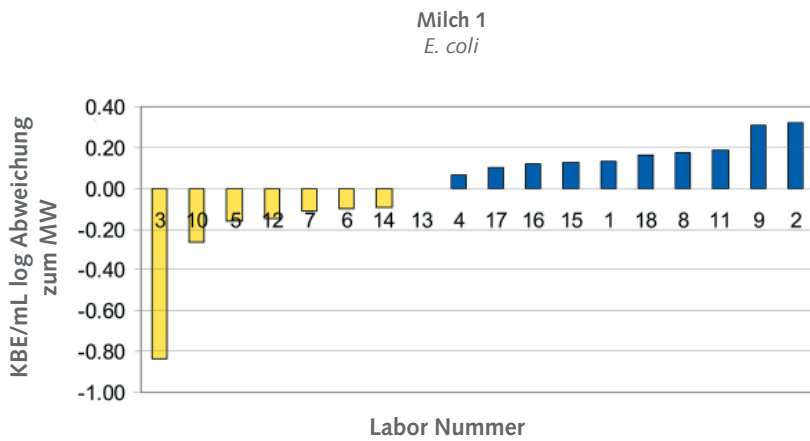


Abb.1: Graphische Darstellung der Abweichung zum Mittelwert für Milch 1

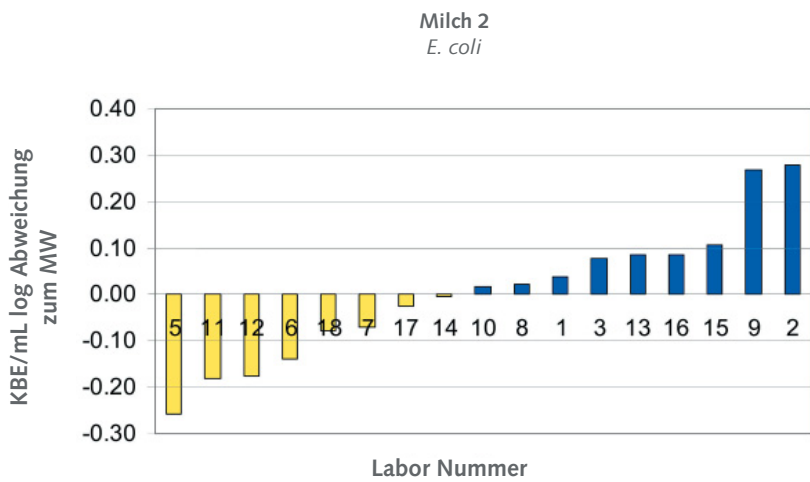


Abb. 2: Graphische Darstellung der Abweichung zum Mittelwert für Milch 2

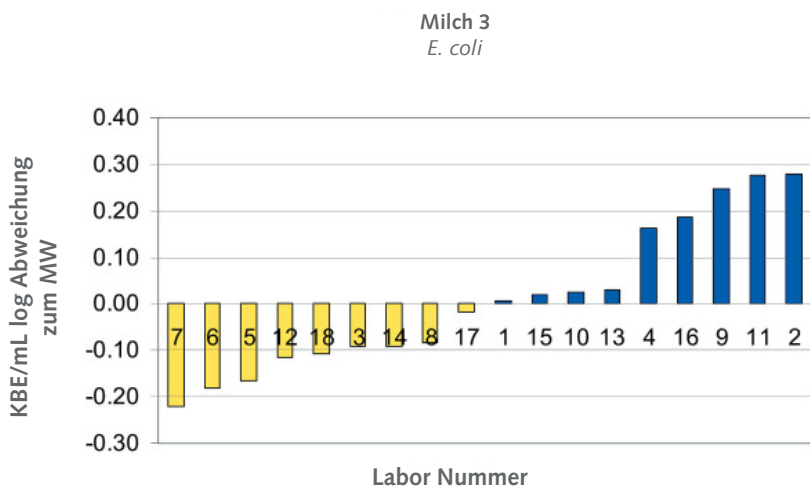


Abb. 3: Graphische Darstellung der Abweichung zum Mittelwert für Milch 3

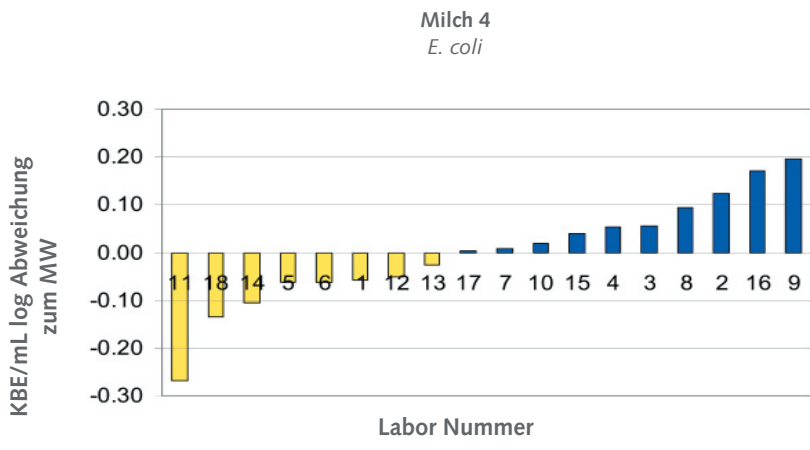


Abb. 4: Graphische Darstellung der Abweichung zum Mittelwert für Milch 4

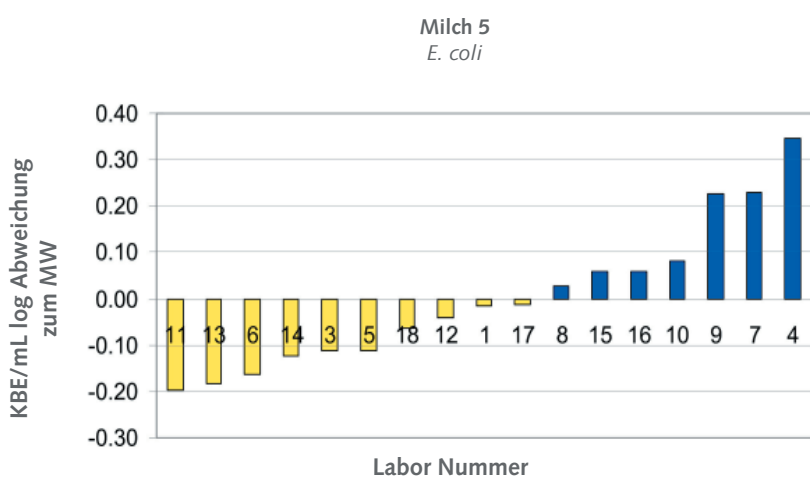


Abb. 5: Graphische Darstellung der Abweichung zum Mittelwert für Milch 5

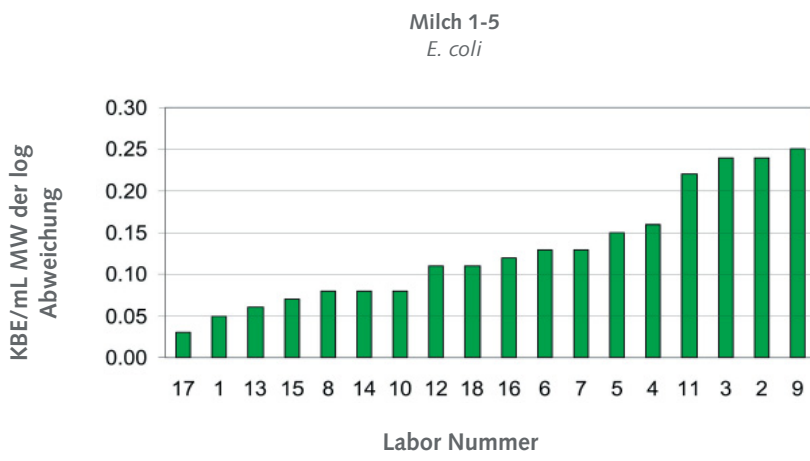
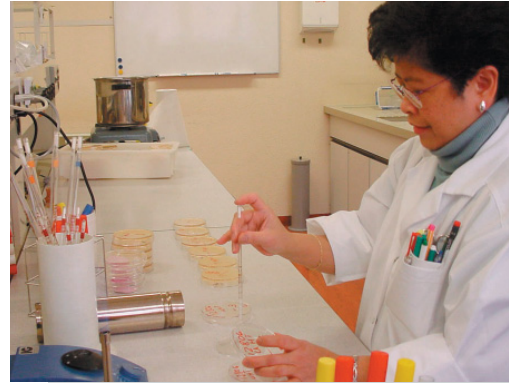


Abb. 6: Graphische Darstellung der Mittelwerte der log Abweichung für Milch 1-5

4. Diskussion

Die Abweichungen der Labormittelwerte zum Gesamtmittelwert sind sehr gering (siehe Tabellen 5 bis 10) und deutlich besser als bei früheren Versuchen. Die mittlere Abweichung aller fünf Proben liegt für jedes Labor unter 0.30 log KBE/mL; ein systematischer Fehler kann ausgeschlossen werden.

Beim Prüfen der Inkubationsbedingungen fällt auf, dass einige Labors bei Temperaturen von 37–38°C inkubieren, während andere bei 42 – 45 °C inkubieren. Für den Nachweis von fäkalen *E.coli*-Bakterien werden in der Regel Temperaturen von über 42 °C empfohlen. Das SLMB (Juli 2000) schreibt bei der Gussplattentechnik eine Inkubation von 18–24h bei 44 +/- 1°C vor.



Corazon Weishaupt
beim Ausplatten

- Milch 1: Die Ergebnisse der Laboratorien 7, 6, 14, 13, 4 und 17 liegen sehr nahe beim oder auf am Mittelwert. Am weitesten entfernt liegen die Ergebnisse von Labor 3.
- Milch 2: Die Ergebnisse der Laboratorien 7, 17, 14, 10, 8 und 1 liegen sehr nahe am Mittelwert. Am weitesten entfernt liegen die Ergebnisse von Labor 9 und 2.
- Milch 3: Die Ergebnisse der Laboratorien 17, 1, 15, 10 und 13 liegen sehr nahe am Mittelwert. Am weitesten entfernt liegen die Ergebnisse von Labor 11 und 2.
- Milch 4: Die Ergebnisse der Laboratorien 1, 12, 13, 17, 7, 10 und 15 liegen sehr nahe am Mittelwert. Am weitesten entfernt liegen die Ergebnisse von Labor 11.
- Milch 5: Die Ergebnisse der Laboratorien 12, 1, 17 und 8 liegen beim oder sehr nahe am Mittelwert. Am weitesten entfernt liegen die Ergebnisse von Labor 4.

Anhang

		KBE/mL				
Labor		Milch 1	Milch 2	Milch 3	Milch 4	Milch 5
1	1. Wert	137000	14600	7600	1470	1150
	2. Wert	86000	10800	5800	1700	940
2	1. Wert	154000	21000	12500	2390	k.W.
	2. Wert	184000	22900	12300	2405	k.W.
3	1. Wert	9000	13200	5700	1500	820
	2. Wert	15000	14300	4900	1400	850
4	1. Wert	80000	k.W.	10000	2800	2280
	2. Wert	108000	k.W.	9000	3000	2520
5	1. Wert	57000	6300	5100	1410	840
	1. Wert	54000	6400	3900	1450	830
6	2. Wert	56000	8600	3200	1700	780
	1. Wert	73000	8100	5800	1700	700
7	2. Wert	58000	9100	4300	1430	1040
	1. Wert	67000	10600	3600	1440	1060
8	2. Wert	130000	11400	5500	2475	1090
	1. Wert	109000	12900	5300	2165	1210
9	2. Wert	156000	23600	11300	2950	1900
	1. Wert	171000	19400	11800	2705	1760
10	1. Wert	64000	11000	6600	1850	1330
	2. Wert	30000	13000	7300	1915	1270
11	1. Wert	124000	8400	5700	590	740
	2. Wert	k.W.	6900	5200	540	630
12	1. Wert	60000	7700	5500	1660	1040
	2. Wert	54000	7700	4600	1550	930
13	1. Wert	80000	14000	7000	1700	700
	2. Wert	k.W.	k.W.	k.W.	k.W.	k.W.
14	2. Wert	67000	11600	5700	1330	780
	1. Wert	63000	11200	4900	1605	840
15	1. Wert	120000	14300	6500	1810	1280
	2. Wert	94000	15200	7200	2165	1190
16	1. Wert	110000	12900	9100	3040	1170
	2. Wert	102000	15200	11000	2375	1310
17	1. Wert	95000	10700	6600	1935	1050
	2. Wert	109000	11000	6000	1740	1040
18	1. Wert	116000	10700	3800	165	1290
	2. Wert	113000	8700	6900	970	670

Tab. 12: Rohdaten (liegen mehr als 2 verwendbare Werte vor, ist der MW aufgeführt)

k.W.: kein Wert