

BESTIMMUNG DER ANZAHL SPOREN VON *C. TYROBUTYRICUM* UND BUTTERSÄURE- BAZILLEN IN MILCH

Technisch-wissenschaftliche Informationen



Inhalt

1. Zusammenfassung	3
2. Experimenteller Teil	4
3. Resultate	5
4. Diskussion	10
5. Anhang	11

ALP science (vormals FAM Info)

Titelbild

Charakteristisches Kolonie-Wachstum
von *C. tyrobutyricum* auf mod. RCM-Agar

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 3-905667-17-7

ISSN 1660-7856 (online)

BESTIMMUNG DER ANZAHL SPOREN VON *C. TYROBUTYRICUM* UND BUTTERSÄUREBAZILLEN IN MILCH

PROFICIENCY TESTING 2003

Ergebnisse der statistischen Auswertung

1. Zusammenfassung

Das Proficiency Testing (PT) zum Nachweis und zur Zählung der Sporen von *C. tyrobutyricum* bzw. von Buttersäurebazillen (BSBZ) in Milch, ist erfolgreich verlaufen. Am PT nahmen 13 Labors aus 9 Betrieben teil. Nach wie vor werden zwei prinzipiell verschiedene Untersuchungsmethoden eingesetzt (Filtration und MPN-Methode).

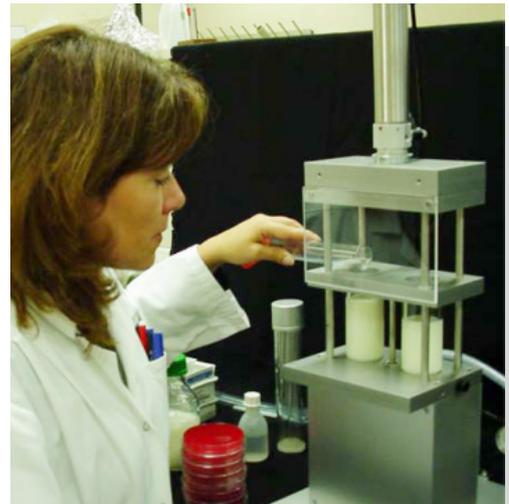
Jedem Labor wurden 2 Milchproben zugestellt. Es war ausreichend Material vorhanden, so dass jede Probe doppelt geprüft werden konnte. Es machten jedoch nur wenige Labors von dieser Möglichkeit Gebrauch. Der Schwerpunkt des Tests lag aber bei der Ermittlung der Wiederholbarkeit R. Alle Labors haben die Ergebnisse zurückgesandt.

Bei der Filtrationsmethode betrug der Vergleichbarkeit s_R bei der Milch A log 0.25 und bei Milch B log 0.32. Die Werten liegen in derselben Größenordnung wie die des Vorjahres (0.28 bzw. 0.25).

Als gut wurden diejenigen Ergebnisse bezeichnet, die nicht mehr als ± 0.50 log KBE/L vom jeweiligen log des Mittelwertes aller Laboratorien abweichen, als sehr gut solche, die nicht mehr als ± 0.30 log KBE/L abweichen.

Die MPN-Methoden wird mit unterschiedlichen Medien und unterschiedlichen Ansätzen angewandt.

Wegen der kleinen Anzahl Werte für diese Methode, konnte keine aussagekräftige statistische Auswertung durchgeführt werden. Die Ergebnisse der MPN-Methode liegen erwartungsgemäss signifikant höher als diejenigen der Filtrationsmethode, da mit der MPN-Methode auch andere BSBZ als *C. tyrobutyricum* erfasst werden. Die MPN-Methode (4x6, 4x3, 4x1 mL) wurde von 4 Betrieben eingesetzt. Ein Labor verwendet die NIZO-Methode bzw. modifizierte NIZO-Methoden, ein weiteres Labor einen modifizierten MPN-Ansatz.



Bedienung der Filtrationapparatur (Foto: ALP)

2. Experimenteller Teil

2.1 Ziel und Problemstellung

Jedes Labor überprüft seine Leistungsfähigkeit in der Zählung der Sporen von *C.tyrobutyricum* bzw. der Sporen der BSBZ. Bereits 1995, 1997/98, 2000, 2001 sowie 2002 wurden entsprechende Vergleichsuntersuchungen durchgeführt.

2.2 Teilnehmende Labors

Am Proficiency Testing beteiligten sich 9 Betriebe mit 13 Laboratorien. Die Namen der Laboratorien wurden den Teilnehmenden in anonymisierter Form zugestellt.

2.3 Probenmaterial und Vorbereitung

Bei den zu untersuchenden Milchproben A und B handelte es sich um zwei mit unterschiedlicher Menge BSBZ–Sporensuspension gespikte UP–Magermilchen. Die gekühlte Milch (4°C) wurde am Vormittag vor dem Versuchstag, mit einer aus Silomilch gewonnenen natürlichen Sporensuspension inokuliert. Die Proben wurden so vorbereitet, dass die Milch A halb so viele Sporen enthalten sollte, wie die Milch B. Für *C.tyrobutyricum* bedeutet dies ca. 270 und 540 Sporen pro Liter.

2.4 Probentransport

Die Zustellung der Versandboxen erfolgte durch die Post. Den Boxen wurde ein tiefgefrorenes Kühlelement beigegeben. Die Proben wurden ca. um 16 Uhr am Vortag des Versuches per A–Post verschickt. Die Proben sind rechtzeitig in den verschiedenen Labors eingetroffen.

2.5 Untersuchungsmethoden

Den Labors wurde empfohlen, die Filtrationsmethode nach Bourgeois/Casey (40 mL) anzuwenden.

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 wurde nicht ermittelt, da zu wenig Ergebnisse von Doppelproben eingegangen waren.

2.6.2 Standardabweichung der Vergleichbarkeit (reproducibility) s_R

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

Mit dem Ringtestprogramm wurde nach Ausreißern bei der Vergleichbarkeit (Grubbs–Test) gesucht.



Grossaufnahme einer Endospore in einem *C. tyrobutyricum* (Foto: ALP)

3. Resultate

Die Labors wurden anonymisiert und mit Nummern versehen.

3.1 Untersuchungsmethode

Labor Nr.	Methode	Medium (Enzym)	Ansatz
1	Filtration	Von FOSS/Bactoscan	Keine Angabe
2	Filtration	Trypsin	Keine Angabe
3	Filtration	Von FOSS/Bactoscan	Keine Angabe
4	Filtration	Von FOSS/Bactoscan	Keine Angabe
5	Filtration	Trypsin, Difco	Keine Angabe
6	Filtration	Von Foss/Bactoscan	Keine Angabe
7	Filtration	Trypsin	Keine Angabe
8	MPN	RC-Agar Pronadisa (Condo, Madrid)	4x je 6, 3 und 1 mL
9	MPN	RC-Agar Difco	4x je 6, 3 und 1 mL
10	MPN	Nach NIZO mod.	4x6, 4x3, 4x1 mL
11	MPN	Nach NIZO mod.	5x10, 5x1, 5x0.1 mL
12	MPN	DK-Agar.	4x je 6, 3 und 1 mL
13	MPN	Keine Angabe	5x 1 mL und 5x0.1 mL

Tab. 1: Verwendete Methoden

3.2 Auswertung

Die Ergebnisse sind in *Tabelle 2 und 3* aufgeführt. Die Keimzahlwerte wurden in Anzahl Sporen **pro Liter** angegeben. Für die Berechnungen wurden die Keimzahlen in ihre logarithmische Form transformiert, um eine bessere Annäherung an eine Normalverteilung zu erhalten. Wo Doppelproben vorlagen, wurden die arithmetischen Mittelwerte (MW) verwendet. Bei der Berechnung der Mittelwerte aller Ergebnisse wurde berücksichtigt, dass die Werte z.T. aus Einzelwerten, z.T. aus den Mittelwerten der Laborergebnissen stammten.

Angaben, wie z.B. > 500 konnten nicht in die Berechnungen einbezogen werden. «Werte» wie < 25 wurden halbiert und auf 13 aufgerundet. Diese Manipulationen haben einen gewissen, wenn auch geringen Einfluss auf die Resultate.

3.2.1 Filtrationsmethode Milch A

Labor Nr.	Milch A		
	MW Sporen/L	MW log Sporen/L	Abweichung vom MW log Sporen/L
1	600	2.78	0.40
2	175	2.24	-0.14
3 ¹⁾	100	2.00	-0.38
4	225	2.35	-0.03
5	375	2.57	0.19
6 ¹⁾	200	2.30	-0.08
7	263	2.41	0.03
MW	239	2.38	

Tab. 2: Ergebnisse der Keimzahlbestimmungen

MW Mittelwert
¹⁾ nur ein Wert vorhanden

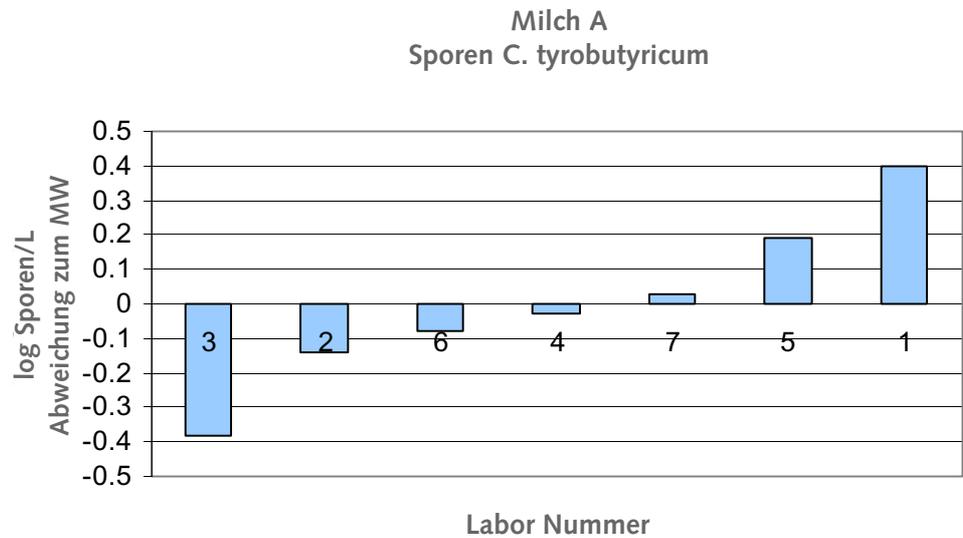


Abb. 1: Abweichungen vom MW (log Sporen/L) in aufsteigender Reihenfolge

3.2.2 Filtrationsmethode Milch B

Labor Nr.	Milch B		
	MW Sporen/L	MW log Sporen/L	Abweichung vom MW log Sporen/L
1	412	2.61	0.15
2	275	2.44	-0.02
3 ¹⁾	200	2.30	-0.16
4	537	2.72	0.26
5	612	2.79	0.33
6 ¹⁾	50	1.70	-0.76
7	450	2.65	0.20
MW	332	2.46	

Tab. 3: Ergebnisse der Keimzahlbestimmungen in aufsteigender Reihenfolge

MW Mittelwert
¹⁾ nur ein Wert vorhanden

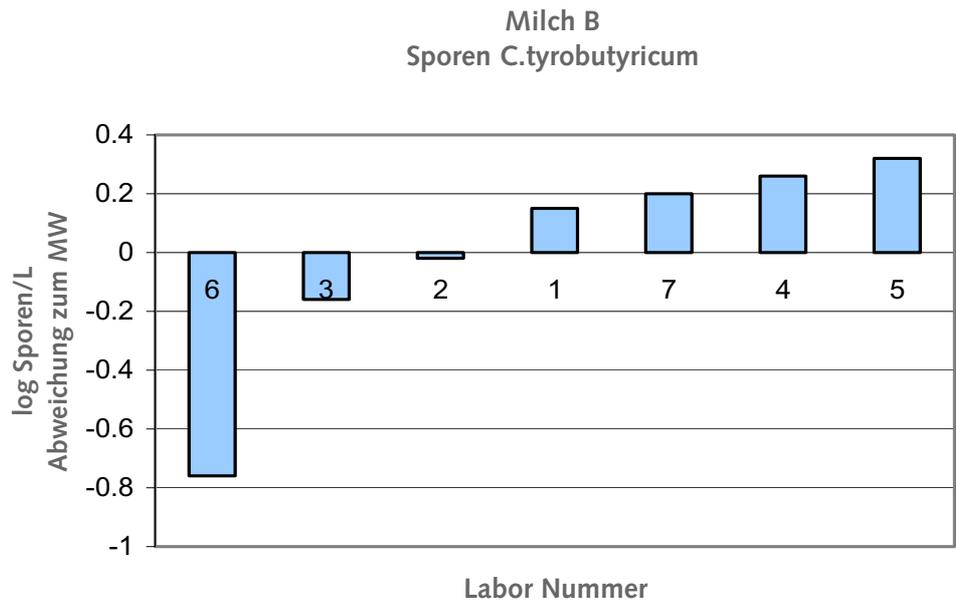


Abb. 2: Abweichungen vom MW (log Sporen/L) in aufsteigender Reihenfolge

3.2.3 Filtrationsmethode
mittlere Abweichung Milch A und B

Labor Nr.	mittlere Abweichung log Sporen/L
2	0.08
7	0.12
4	0.15
5	0.26
3	0.27
1	0.28
6	0.42

Tab. 4: Mittlere Abweichungen von den Mittelwerten für Milch A und B

Milch A und B
Sporen C. tyrobutyricum

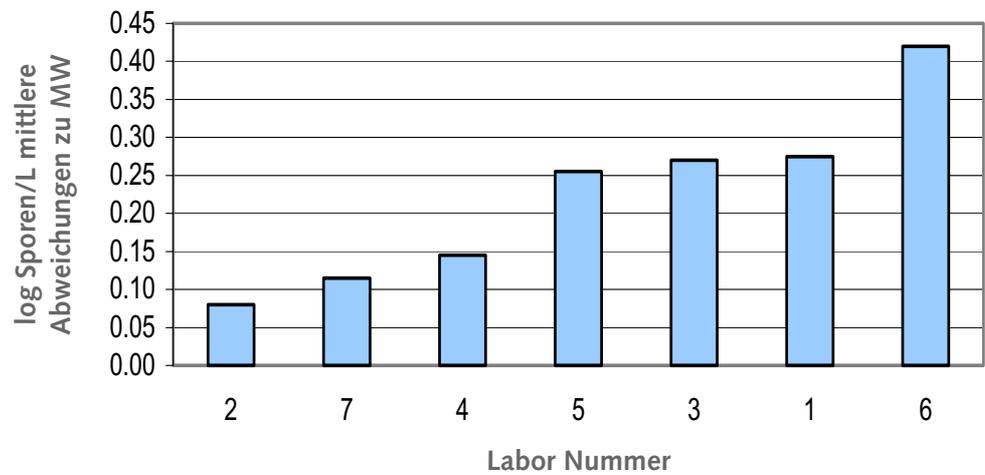


Abb. 3: Mittlere Abweichungen vom MW (log Sporen/L) in aufsteigender Reihenfolge

3.2.4 MPN-Methode Milch A

Milch A		
Labor Nr.	Kennzahlen	Sporen pro L
8	343/441	> 5'000
9	440/341	400
10	320	193
11	420	220
12	321/341	240/400
13		1100/2500

Tab 5: Ergebnisse der Keimzahlbestimmungen

3.2.5 MPN-Methode Milch B

Milch B		
Labor Nr.	Kennzahlen	Sporen pro L
8	442/444	>500/>500
9	433/434	>500/>500
10	220	133
11	311	140
12	443/441	>1000/1000
13		3500/2500

Tab. 6: Ergebnisse der Keimzahlbestimmungen

3.3 Toleranzen

Beim Festlegen von Limiten ist zu bedenken, dass neben der zufälligen Streuung auch die Art des Probenmaterials, die Robustheit der Methode und die Erfahrung der Mitarbeiter etc. einen wesentlichen Einfluss spielen.

Sofern es sich um etwas heiklere Methoden, mit einer grossen Streuung handelt, erachten wir einen Abweichungsbereich der bereinigten Ergebnisse von ± 0.50 log Sporen/L vom Mittelwert, als angezeigt.

Wenn die MitarbeiterInnen bei dieser Methode über ausreichend Erfahrung und Routine verfügen, kann diese Grenze auf ± 0.30 log gesenkt werden.

4. Diskussion

4.1 Beurteilung der Ergebnisse

4.1.1 Filtrationsmethode

Sämtliche Ergebnisse liegen erfreulicherweise innerhalb der Limiten von ± 0.50 log Sporen/L vom Mittelwert.

Die geringsten Abweichungen vom Mittelwert weisen die Labors 4 und 7 bei Milch A sowie 1 und 2 bei Milch B auf.

Vermutlich liegt bei der Milch B der Wert des Labors 6 etwas zu tief, dadurch wird der Mittelwert hinunterdrückt. Der «wahre» Wert liegt wahrscheinlich etwas höher. Allerdings ortet der Ausreissertest nach Grubbs diesen Wert nicht als Ausreisser.

4.1.2 MPN - Methode

Bei der Milch A liegen die Ergebnisse der Labors zwischen 193 und 2500 Sporen pro L, bei der Milch B zwischen 133 und 3500. Die Ergebnisse streuen zu stark und es gibt zuviel Werte mit dem Ergebnis > 1000 um eine sinnvolle statistische Auswertung durchzuführen. Auf Grund der Ergebnisse lässt sich nicht zeigen, dass die Milch B etwa die doppelte Sporenzahl der Milch A aufweist.

4.2 Standardabweichungen s_R (Filtrationsmethode)

Vergleich der Ergebnisse mit den entsprechenden Ergebnissen früher (ausreisserbereinigter) PT's.

4.3 Schlussfolgerungen

Bei der Filtrationsmethode ist das Proficiency Testing 2003 erfolgreich verlaufen. Die Abweichungen vom Mittelwert liegen alle innerhalb der «tolerierten» Streuung. Die Standardabweichung der Vergleichbarkeit bei der Milch B liegt etwas höher als beim letzten Proficiency Testings (siehe Tabellen 7). Der Test zeigt, dass die Filtrationsmethode von den teilnehmenden Labors fachgerecht durchgeführt wird.

Für die MPN-Methode müsste eine wesentlich grössere Anzahl Laboratorien am PT teilnehmen, um trotz der methodischen Streuung und der Schwierigkeiten bei der Durchführung, zu genügend auswertbaren Ergebnissen zu kommen.

Das Proficiency Testing verdeutlicht erwartungsgemäss, dass die Filtrationsmethode tiefere Werte ergibt als die MPN-Methoden. Der Grund liegt vor allem darin, dass das Sporenmateriale mit welchem die Milch gespiked wurde neben *C.tyrobutyricum* auch andere Clostridienspezies enthält.

Es ist vorgesehen 2004 weitere Proficiency Testings mit *C.tyrobutyricum* durchzuführen, wobei wir uns dann voraussichtlich auf die Filtrationsmethode beschränken werden. Auf Grund der routinierteren Handhabung erscheint es möglich, die tolerierbare Streuung von 0.50 auf 0.30 log Sporen/L zu senken.

Jahr	Milch	n	Sporen/Liter GMW bzw. MW	log Sporen/Liter GMW bzw. MW	s_R
2000	A	8	35	1.54	0.40
	B	8	120	2.08	0.28
2001	A	7	51	1.71	0.25
	B	7	110	1.92	0.26
2002	A	10	437	2.64	0.28
	B	8	315	2.50	0.25
2003	A	7	256	2.40	0.25
	B	7	323	2.51	0.32

Tab. 7: Zusammenstellung der Ergebnisse 2000–2003

n Anzahl Labors
GMW geometrischer Mittelwert
 s_R Standardabweichung der Vergleichbarkeit

5. Anhang

Labor	Milch A Sporen/L	Milch B Sporen/L
1	575/625	500/325
2	175/175	275/275
3 ¹⁾	100	200
4	225/225	400/675
5	425/325	500/725
6 ¹⁾	200	50
7	200/325	450/450

Tab. 8: Rohdaten: Filtrationsmethode

¹⁾ nur ein Wert vorhanden

Labor	Milch A		Milch B	
	Kennziffer	Sporen/L	Kennziffer	Sporen/L
8	343	>500	442	>500
8	441	>500	444	>500
9	440	>500	433	>500
9	341	400	434	>500
10	320	193	220	133
11	420	220	311	140
12	321	240	443	>1000
12	341	400	441	>1000
13	Keine Angabe	1100	Keine Angabe	3500
13	Keine Angabe	800	Keine Angabe	2500

Tab. 9: Rohdaten MPN – Methoden