

Einfluss des Untersuchungszeitpunkts nach der Probenahme auf die Gesamtkeimzahl von Milch

Gérald Pittet¹, Werner Luginbühl² und Thomas Berger³

¹Suisselab AG, 3052 Zollikofen

²CHEMSTAT, Chemometrik und Statistik, 3005 Bern

³Forschungsanstalt Agroscope Liebefeld-Posieux ALP-Haras, 3003 Bern

Auskünfte: Gérald Pittet, E-Mail: gerald.pittet@suisselab.ch, Tel. +41 31 919 33 88

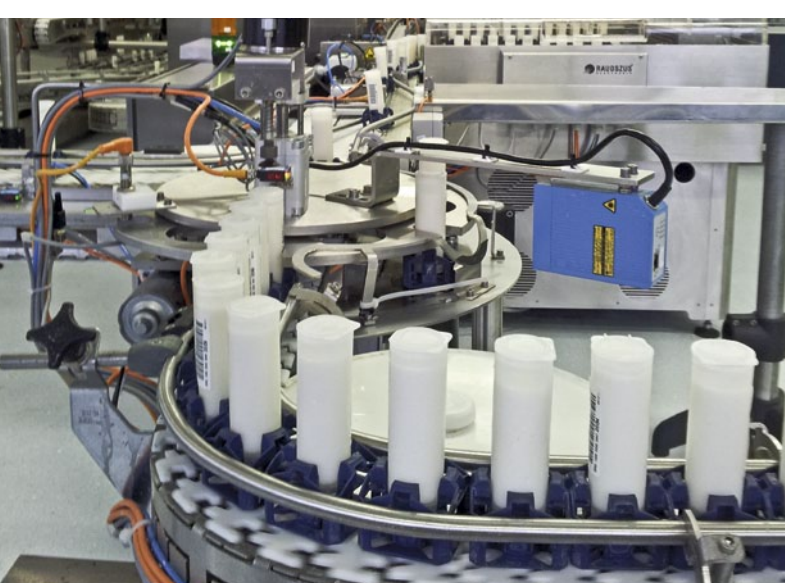


Abb. 1 | Registration der Proben bei Suisselab.

Einleitung

Die Anzahl der Schweizer Milchproduzenten schrumpft und die Zahl der Kühe pro Hof nimmt zu. Veränderte Rahmenbedingungen und der Kostendruck führten auch bei der Milchprüfung zu einer Reduktion der verschiedenen kantonalen und regionalen MIBD-Labors auf heute ein Labor für die ganze Schweiz, Abb. 1 (Gerber *et al.* 2007; Glodé *et al.* 2010). Von den zurzeit rund 27000 Schweizer Milchproduzenten liefern rund 47% ihre Milch alle zwei Tage ab Hof. In diesen Fällen wird die Milch durch einen Milchsammelwagen abgeholt und die Milchproben werden automatisiert entnommen. Die übrigen ca. 53% der Produzenten liefern ihre Milch in eine gewerbliche Käserei oder in eine Milchsammelstelle (Abholung beim Produzenten oder bei Milchsammelstellen; Berger, 2010). Die Anlieferung der Milch durch die Produzenten in einer Milchsammelstelle erfolgt in der Regel einmal oder zweimal pro Tag. Die Probenahme wird manuell durch eine dafür ernannte Person durchgeführt (Abb. 2). Die Sammelstellenmilch wird aber meistens nur alle zwei Tage durch den Milchsammelwa-

gen abgeholt. Aus Zeit- und Kostengründen bringt ein Teil der Produzenten (ca. 10 bis 20%) ihre Milch abgestimmt auf die Abfuhr der Sammelstellenmilch nur noch alle zwei Tage. Dieser Trend ist auch in den Berg- und Hügellgebieten zunehmend, da mit diesem Einlieferungsintervall grössere Kosteneinsparungen erzielt werden können.

Gemäss «Technische Weisung für die Durchführung der Milchprüfung» (BVET, 2010) muss Suisselab, welche die Milchprüfung im Auftrag des Bundes und der milchwirtschaftlichen Branche durchführt, sicherstellen, dass qualitative Veränderungen der Proben von der Probenerhebung bis zur Untersuchung vermieden werden und die Konservierung der Proben ausschliesslich durch Kühlung und Kühllhaltung erfolgt. Der maximale Zeitraum zwischen Probenerhebung und Analysenbeginn beträgt deshalb 30 Stunden. Damit diese Vorgaben eingehalten werden können, muss Suisselab die Probenahme auf die Einlieferungsdaten einzelner Milchsammelstellen abstimmen.

Beim Erstellen des Probenahme- und Probesammelplans muss auf viele verschiedene Faktoren Rücksicht genommen werden (Laborauslastung, Unregelmässigkeiten bei den Wochen- und Montagstagen, regionale Feiertage, verfügbare Probesammler, Sammelkosten, Zeitraum zwischen erster und zweiter Monatsprobe, usw.). Aus diesem Grund kann nur sehr beschränkt auf individuelle Wünsche Rücksicht genommen werden. Monatlich liegen von ca. 1000 bis 1200 Milchlieferanten nur Einzelwerte statt der geforderten zwei Werte vor. Aus den zwei Einzelwerten wird monatlich ein geometrischer Mittelwert berechnet, der in vier Monaten maximal dreimal, beziehungsweise viermal überschritten werden darf. Danach wird der betroffene Produzent mit einer Milchliefer Sperre belegt. Von den fehlenden Werten stammen rund 50% aus manuell gefassten Proben und davon ist wiederum ein Teil darauf zurückzuführen, dass das Aufgebot nicht mit dem Milcheinlieferungsdatum in der Milchsammelstelle übereinstimmt.

Suisselab durchfährt das Sammelgebiet einer Probetour aus Kostengründen in der Regel nur einmal pro



Abb. 2 | Manuelle Probenahme für die Milchprüfung.

Kampagne. Da aber in einem Sammelgebiet mehrere Käufer Milch übernehmen, sind die Abholtage unter den Käufern nicht abgestimmt. Das heisst, der eine Milchkäufer holt seine Sammelstellen an einem geraden, ein anderer an den ungeraden Tagen ab. Somit hat Suiselab keine Möglichkeit, den Probeerhebungsplan nach den Milchabfuhrdaten auszurichten. Um alle Sammelstellen auf den richtigen Tag anzubieten und darauf abgestimmt die Proben einzusammeln, müsste Suiselab viele Sammelgebiete zwei Mal anfahren, was mit erheblichen Mehrkosten verbunden wäre. Davon betroffen sind ca. 80 Sammelstellen und ca. 38 Sammeltouren. Berechnungen zeigen einen Zusatzaufwand pro Monat von 89 Stunden, 4697 km oder CHF 5281.–, beziehungsweise pro Probekampagne CHF 2600.–, pro Jahr (24 Kampagnen) CHF 62800.– und pro Probe CHF 4.– bei rund 650 Produzenten (Pittet 2011).

Unter den Mitgliedern der «Technischen Arbeitsgruppe Milchprüfung» und der Milchprüfungskommission besteht Konsens, dass die Zusatzkosten nicht auf die allgemeine Rechnung der Milchprüfung abgewälzt werden soll. Damit ergeben sich folgende Lösungsansätze:

A Die Untersuchungszeit wird in den betroffenen Fällen (und nur dort) auf 36 Stunden nach der Probenahme ausgedehnt. Grundlage für die Festlegung der 30 Stunden war ein Versuch zur Keimvermehrung (Bühlmann *et al.* 1999). Aufgrund der langjährigen Erfahrung bei Suiselab und bei Qualitas ist gegenüber 1999 >

Zusammenfassung ■ Monatlich liegen von ca. 1000 bis 1200 Milchlieferanten nur Einzelwerte statt der geforderten zwei Werte der amtlichen Milchprüfung vor. Von den fehlenden Werten stammt ein Teil aus Sammelstellen mit zweitägiger Milcheinlieferung und manueller Probenahme und ist auf zeitliche Unterschiede zwischen dem Probenahmeaufgebot und dem Milcheinlieferungsdatum zurückzuführen. Mit der Erhöhung des maximalen Zeitraums zwischen Probenerhebung und Analysebeginn von 30 auf 36 Stunden bietet sich eine einfache und kostengünstige Lösung zur Behebung des Problems an. Sie führt nur zu einer geringfügigen Zunahme der Proben im Beanstandungsbereich zwischen 0,07 und 1,25%. Der Anteil an beanstandeten Proben nahm in der vorliegenden Untersuchung somit von 1,397% bei 30 Stunden auf 1,468% bis 2,648% bei 36 Stunden zu. Dies wird als vertretbarer Nachteil akzeptiert, der nur wenige Milchproduzenten betrifft und auch nur diejenigen, deren Milch nach 30 Stunden Keimzahlen nahe der Beanstandungsgrenze aufweisen. Die Benachteiligung dürfte sogar geringer ausfallen, da nur ein Teil der Zunahmen beide Proben eines Monats betrifft und deshalb bei der öffentlichen Milchkontrolle nach der Bildung des geometrischen Mittelwertes, wirklich zu einer Beanstandung führt.



Abb. 3 | Konsequente Einhaltung der Kühlkette während des Probentransportes.

davon auszugehen, dass die Kühlkette (max. 5 °C) unter den heute üblichen Bedingungen besser eingehalten und überprüft wird. Bei konsequenter Kühlung der Proben und Einhaltung der Kühlkette während des Transportes sollte keine wesentliche Erhöhung der Gesamtkeimzahl (GKZ) erfolgen (Abb. 3). Die anderen amtlichen und privatrechtlichen Merkmale verändern sich in den zusätzlichen sechs Stunden nur minimal.

B Suisselab organisiert separate Sammeltouren und verrechnet den Milchkäufern die zusätzlichen Aufwendungen anhand des Kilometer- und Zeitaufwandes.

Der Lösungsansatz A wurde von den Mitgliedern der Milchprüfungskommission favorisiert. Vor einem Beschluss musste aber die zu erwartende Keimvermehrung und das Ausmass der resultierenden Benachteiligung der betroffenen Produzenten in einem Versuch ermittelt werden.

Methode

Basis für die Erhebung waren echte Milchproben aus der automatisierten Probenahme eines grösseren Einzugsgebietes. Dies gewährleistete eine Milchmatrix mit vier Gemelken und eine genügende Variabilität der Milchflora. Auf eine gesamtschweizerische Erhebung konnte verzichtet werden, da in der vorliegenden Fragestellung keine geografischen oder strukturellen Unterschiede ermittelt werden sollten, sondern die Dynamik der Keimvermehrung. Im Fokus stand eine allfällige Zunahme im Beanstandungsbereich der öffentlich-rechtlichen Milchprüfung. In der Erhebung musste deshalb eine genügende Anzahl Proben im Bereich 30 000 bis 79 000 Keime/mL vorliegen, welche in den zusätzlichen sechs Stunden Lagerung die Grenze von 80 000 Keimen/mL überschreiten

konnten. Auch im privatrechtlichen Qualitätsbezahlungssystem der Milchbranche ist die Grenze von 80 000 Keimen/mL für die Bildung von Abzügen von Bedeutung, ebenso die Grenze von 10 000 Keimen/mL, für die Bezahlung von Zuschlägen. Die Umrechnung der BactoScan-Impulse auf die GKZ basiert auf der 2006 ermittelten Umrechnung.

Versuchsaufbau

Die Erhebung wurde auf eine Zufallsstichprobe von $n = \text{ca. } 500$ ausgelegt, damit auch Proben mit «grenzwertnahen» und hohen Keimzahlen in der Stichprobe enthalten waren. Als Proben wurden solche mit vier Gemelken verwendet (zweitägige Milch, letztes Gemelk ab 6 Uhr). Aus Kapazitätsgründen wurde der Versuch auf sechs Tage im Zeitraum Juli und August 2011 verteilt. Die Proben wurden bei Emmi Ostermundigen und Suhr sowie Hochdorf Nutritec in Sulgen gesammelt. Der Probeauftrag ging direkt an die beteiligten Transportfirmen (TGL AG, Rolli Transporte AG, Meyer Transport AG und AS milch-logistik GmbH). Nach Probееingang im Labor wurden die Proben gesplittet. Beim Splitten erhielt jede Probe einen Barcode, damit die Rückverfolgbarkeit zur Ausgangsprobe, zur Untersuchungsserie und zum Milchproduzenten sichergestellt war. Bis zur Untersuchung wurden die Proben bei 1 bis 5 °C gelagert. Die Proben wurden um 12.00 Uhr (1. Probeteil) und 18.00 Uhr (2. Probeteil) des Folgetages untersucht (Abb. 4). Dies entspricht einem Probenalter von 30 und 36 Stunden ab letztem Gemelk. Die ältesten Gemelke hatten somit ein Alter von ca. 66 beziehungsweise 72 Stunden.



Abb. 4 | Bestimmung der Gesamtkeimzahl mit Foss BactoScan.

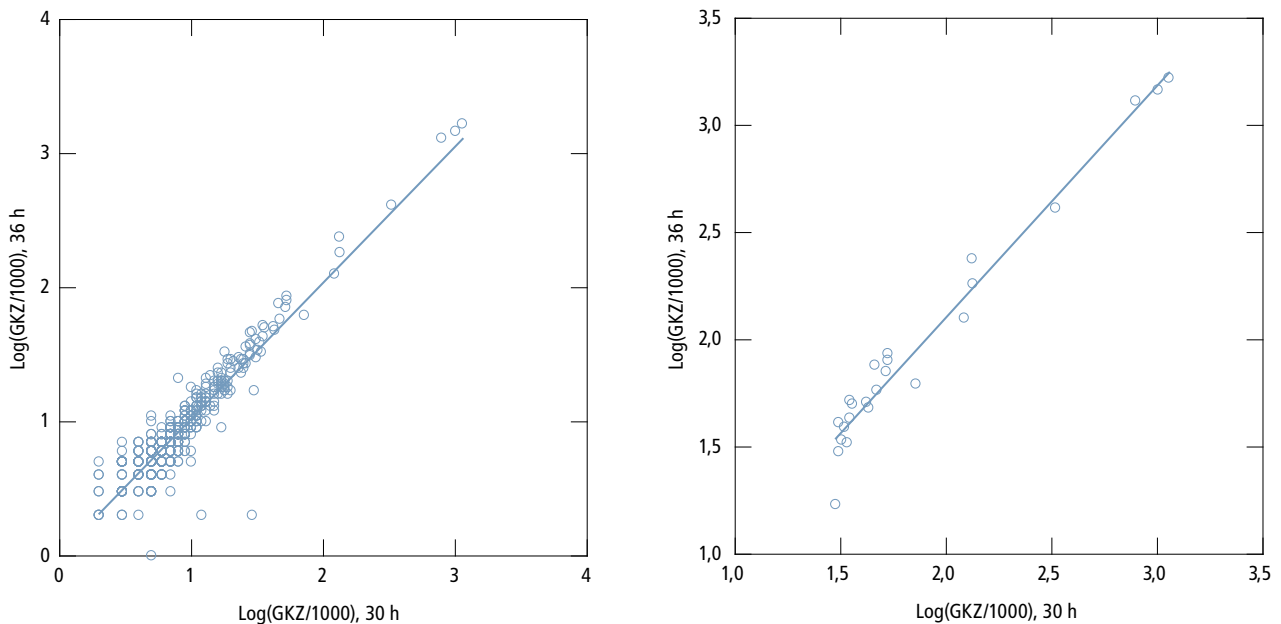


Abb. 5 | Streudiagramme der logarithmierten Daten nach 30 vs. 36 Stunden, der ganzen Stichprobe (A) und der Proben mit einer GKZ $\geq 30\,000$ Keime/mL (B).

Geräte und Software

Probenahmeflaschen vom Typ BRV1, Inhalt ca. 45 mL, wurden durch Suisselab bereitgestellt.

Messgerät: BactoScan FC (Foss Instruments, Slangerupgade 69 DK-3400 Hillerød)

Software: SYSTAT 13, Systat Software, Inc., 225 W Washington St., Suite 425, Chicago, IL 60606; R version 2.13.1 (2011–07–08); Copyright (C) 2011 The R Foundation for Statistical Computing, ISBN 3–900051–07–0.

Resultate

Die Erhebung erfolgte an sechs Tagen im Zeitraum vom 7. Juli bis 19. August 2011 und umfasste 503 Proben mit 501 gültigen, verwertbaren Datensätzen. Die logarithmierten Daten der ganzen Stichprobe und der Proben, welche bei der ersten Messung eine GKZ von $\geq 30\,000$ Keime/mL aufwiesen, zeigen die typische, nicht normalverteilte Streuung (Abb. 5).

Tab. 1 | Häufigkeiten der interessierenden GKZ-Gruppen

GKZ-Bereich [Keime/mL]	30 Stunden		36 Stunden	
	Anzahl Ergebnisse [n]	Anteil [%]	Anzahl Ergebnisse [n]	Anteil [%]
30 000 bis 79 000	17	3,4	23	4,6
$\geq 80\,000$	7	1,4	9	1,8

Die Auswertung der GKZ bei Proben unter 30 000 Keime/mL zeigt nur geringe Zunahmen der Durchschnittswerte. Die Zunahme beträgt im Mittel 300 Keime/mL im Bereich < 8000 Keime/mL und 1200 Keime/mL im Bereich 8000 bis 29 000 Keime/mL, weshalb auf eine detaillierte Auswertung verzichtet wurde. Die Auswertung der Probehäufigkeiten in den zwei relevanten GKZ-Gruppen zeigt in beiden Fällen eine Zunahme innerhalb der sechs Stunden. Im Bereich zwischen 30 000 bis 79 000 Keime/mL nahm die Zahl der Ergebnisse um sechs, im Beanstandungsbereich (≥ 80000 Keime/mL) um zwei zu (Tab. 1). Die Zunahme im Beanstandungsbereich beträgt 0,4% (bezogen auf die ganze Stichprobe von 501 Ergebnissen) oder 28,6% (bezogen auf die sieben Proben im Beanstandungsbereich bei 30 Stunden). Keine Probe, welche nach 30 Stunden im Beanstandungsbereich lag, hatte nach 36 Stunden einen Wert unter der Grenze von 80 000 Keime/mL.

Mit verschiedenen statistischen Testverfahren wurde geklärt, inwieweit die beiden verbundenen Stichproben korrelieren und vergleichbar sind und ob die Zunahme im Beanstandungsbereich signifikant ist.

Korrelationen und paarweise Vergleiche: Der Spearman-Rangkorrelationskoeffizient ist zwar signifikant von 1,0 verschieden, nicht jedoch von 0,995 beziehungsweise von 0,9987. Der exakte Test zeigt für das 99% Vertrauensintervall keine Abweichung vom Wert 1. Im Wilcoxon-Test sind die zwei verbundenen Stichproben verschieden. Für wiederholte Messungen eignen sich auch lineare gemischte Modelle. Die Differenz der Kleinst-Quadrate- ➤

Tab. 2 | Resultate der statistischen Testverfahren

Test	Nullhypothese	p-Wert*	Kommentar
Test auf gleiche Anteile im Beanstandungsbereich nach 30 und 36 Stunden (Test für unabhängige Stichproben), zweiseitiger Test	Gleichheit des Anteils in beiden Gruppen (30 und 36 Stunden)	0,6142	Bei Vernachlässigung der Verbundenheit der zwei Datenreihen sind die zwei Anteile (1,3972 % und 1,7964 %) statistisch nicht verschieden.
Test auf gleiche Anteile im Beanstandungsbereich nach 30 und 36 Stunden (Test für unabhängige Stichproben), einseitiger Test		0,3071	
Test auf Signifikanz der Zunahme der Ergebnisse im Beanstandungsbereich (Konfidenzintervall einer unbekannteren Wahrscheinlichkeit, Binomialverteilung, Clopper-Pearson- und Blyth-Still-Casella-Schätzung)	Keine Zunahme, $\pi = 0$	< 0,001	Die Zunahme ist signifikant (die beobachtete Zunahme des Anteils um 0,004 (0,3992 %, Differenz aus 1,3972 % und 1,7964 %) liegt zwar innerhalb der geschätzten 95 %-Vertrauensgrenzen, ist aber im exakten Test trotzdem signifikant, weil die Vertrauensgrenzen für Binomialparameter nahe bei null nicht zuverlässig geschätzt werden können).

*p-Wert des Tests; Werte < 0,05 wurden in dieser Auswertung als statistisch signifikant betrachtet.

Mittelwerte der GKZ-Logarithmen nach 30 respektive 36 Stunden ist in diesem Modell signifikant. Die Residuen zeigen jedoch eine beträchtliche Abweichung von der Normalverteilung, so dass der Test nur mit Vorbehalt zu interpretieren ist. Je nach Testverfahren ist somit die Zunahme der GKZ innerhalb der sechs Stunden signifikant. Ob auch die Zunahme im Beanstandungsbereich signifikant ist, wurde mit weiteren Tests untersucht (Tab. 2).

Damit stellt sich die Frage, mit welcher maximalen und minimalen Wahrscheinlichkeit die beobachtete Zunahme statistisch verträglich ist. Variiert man die Nullhypothese, so ergibt sich schliesslich für den maximalen Wert ein $p_0 = 0,01251$ und für den minimalen Wert ein $p_0 = 0,00071$. Die maximale Wahrscheinlichkeit, welche mit einer Zunahme um zwei Werte im Beanstandungsbereich (aus 501 Proben) statistisch verträglich ist, beträgt somit 1,251 %. Die minimale Wahrscheinlichkeit, welche mit einer Zunahme um zwei Werte im Beanstandungsbereich (aus 501 Proben) statistisch verträglich ist, beträgt nur 0,071 %. Das bedeutet, dass die Zunahme im Beanstandungsbereich durch die um sechs Stunden verlängerte Lagerdauer mindestens 0,071 und höchstens 1,251 % beträgt. In der vorliegenden Stichprobe nimmt der Anteil somit von 1,397 % bei 30 Stunden auf 1,468 % bis 2,648 % bei 36 Stunden zu.

Diskussion

Trotz der besseren Transportbedingungen gegenüber 1999 und einer konsequenten Einhaltung der Kühlkette nimmt die GKZ während der Probelagerung laufend zu. Mit der Erhebung konnte gezeigt werden, dass die Ausdehnung des Untersuchungszeitraums von 30 auf 36 Stunden nur eine geringfügige Zunahme der Proben im Beanstandungsbereich zwischen 0,07 und 1,25 Prozent zur Folge hat. Eine genauere Schätzung der Zunahme wäre

nur mit einer grösseren Stichprobe von etwa 850 Proben möglich gewesen. Dieser Wert lässt sich aus den Milchprüfungsdaten von 2010 abschätzen (Berger und Luginbühl, 2011). Auf die Erhebung einer grösseren Stichprobe wurde wegen des Aufwandes verzichtet. Für die in der Kommission Milchprüfung vertretenen Mitglieder der Branche ist die auf dieser Datenbasis ermittelte Sicherheit gross genug und die geschätzte Zunahme und resultierende Ungleichbehandlung der betroffenen Produzentengruppe vertretbar. Auf die Paralleluntersuchung mit dem Referenzverfahren (Plattenverfahren) wurde verzichtet. In der Praxis kommt ausschliesslich das automatische, flow-zytometrische Verfahren zur Anwendung.

Schlussfolgerungen

- Die Erhöhung des maximalen Zeitraums zwischen Probenerhebung und Analysebeginn von 30 auf 36 Stunden für die Proben aus Milchsammelstellen mit zweitägiger Abholung und manueller Probenahme ist die einfachste und kostengünstigste Lösung zur Behebung der beschriebenen Probleme bei der Erhebung der geforderten zwei Proben.
- Die aus der Erhöhung dieser Zeitspanne resultierende Zunahme der Proben im Beanstandungsbereich um 0,07 bis 1,25 % wird als vertretbarer Nachteil akzeptiert, der nur wenige Milchproduzenten betrifft und auch nur diejenigen, deren Milch nach 30 Stunden Keimzahlen nahe der Beanstandungsgrenze aufweisen.
- Die Benachteiligung dürfte sogar geringer ausfallen, da nur ein Teil der Zunahmen beide Proben eines Monats betrifft und deshalb bei der öffentlich-rechtlichen Milchkontrolle nach der Glättung durch die Bildung des geometrischen Mittelwertes wirklich zu einer Beanstandung führt. ■

Riassunto**Influenza della durata dell'intervallo tra prelievo di campioni e analisi sulla carica batterica del latte**

Ogni mese, circa 1000–1200 fornitori di latte dispongono soltanto di un unico risultato d'analisi anziché di due, come prevedono le basi legali relative al controllo del latte. L'assenza di una parte dei valori è da associare al fatto che in alcuni centri di raccolta la fornitura di latte avviene a volte ogni due giorni. Se la data di consegna non corrisponde alla data dell'ordine di prelievo e quindi alla raccolta di campioni, il prelievo non può essere effettuato. Abbiamo constatato che con l'incremento dell'intervallo massimo tra prelievo di campioni e inizio delle analisi da 30 a 36 ore si può risolvere il problema in maniera semplice ed economica. Ciò comporta soltanto un lieve incremento, compreso tra il 0,07 e l'1,25 per cento, dei campioni per i quali vengono pronunciate contestazioni. La proporzione di risultati che portano ad una contestazione è infatti di 1,397 % con un intervallo di 30 ore e di 1,468–2,648 % con un intervallo di 36 ore. Tale svantaggio può essere considerato accettabile e si riferisce solo ai risultati già relativamente vicini alla soglia di contestazione. Dovrebbe essere ulteriormente ridotto dall'effetto d'appiattimento della media geometrica, la quale è determinante per la valutazione della qualità disciplinata dal diritto pubblico.

Summary**Influence of the storage period between sampling and analysis on total bacterial count in milk**

Every month, only one official milk-testing result is available from between 1000 and 1200 milk producers instead of the two required. Of the missing results, one part originates from milk-collection centers where milk delivery takes place every other day and sampling is performed manually, and is therefore attributable to the time delay between sampling notification and milk delivery. Extending the maximum time allowed between sampling and commencement of the analysis from 30 to 36 hours would provide an easy and cost-effective method to solve this problem. The increase in the number of samples with results above the maximum permitted limit would be slight: In the present study, the percentage increased from 1,397 % at 30 hours to 1,468 – 2,648 % at 36 hours, representing a rise of 0,07 – 1,25 %. This can be accepted as a justifiable drawback as it would affect very few producers and only those whose milk at 30 hours contains bacterial counts close to the official limit. The overall discrimination would probably be even lower as the increased time span would not necessarily affect both monthly samples and therefore, after calculation of the monthly geometric mean as required by the public-law milk quality control, the results may well remain within the limits set.

Key words: total bacteria count, milk, sampling, extension of storage period.

Literatur

- Berger T., 2010. Questionnaire on the Determination of total bacterial count in raw milk in European Member States. EU Reference Laboratory on Milk and Milk Products, 4 Seiten.
- Berger T. & Luginbühl W., 2011. Qualitätskontrolldaten Rohmilch (Dezember 2010) - Données du contrôle de la qualité du lait cru (décembre 2010). Mail vom 03.02.2011.
- Bühlmann G., Aebi R. & Glättli H., 1999. Wie PetriFoss und BactoScan 8000 die Keimbelastung von Hofabfuhr-Milch je nach Lagerungszeit und Temperatur beurteilen. Interner Bericht 37/1999, Forschungsanstalt für Milchwirtschaft FAM, 50 Seiten.
- BVET, 2010. Technische Weisung für die Durchführung der Milchprüfung. 14. März 2011, 13 Seiten.
- Gerber D., Bühlmann G., Seelhofer N., Thürlemann P., Berger T. & Jakob E., 2007. Der MIBD - Rückblick auf eine zehnjährige Pionierleistung. *Agrarforschung* 14, (10), 496–501.
- Glodé M., Gehrig P. & Falk M., 2011. Milchprüfung ändert auf 2011. Information BVET, 20.10.2010, 2 Seiten.
- Pittet G., 2011. Kostenschätzung zusätzlicher separater Sammel Touren bei Sammelstellen mit zweitägiger Anlieferung. Information Suisse lab, Sitzung Milchprüfungskommission, 9. September 2011, 2 Seiten.