

# ILNAS

Institut luxembourgeois de la normalisation  
de l'accréditation, de la sécurité et qualité  
des produits et services

## ILNAS-EN 15788:2021

### **Futtermittel: Probenahme- und Untersuchungs-verfahren - Nachweis und Zählung von Enterococcus spp. (E. faecium) als Futtermittelzusatzstoff**

Animal feeding stuffs: Methods of  
sampling and analysis - Detection and  
enumeration of Enterococcus (E.  
faecium) spp. used as feed additive

Aliments des animaux: Méthodes  
d'échantillonnage et d'analyse -  
Détection et dénombrement des souches  
de Enterococcus (E. faecium) spp.

11/2021



## Nationales Vorwort

Diese Europäische Norm EN 15788:2021 wurde als luxemburgische Norm ILNAS-EN 15788:2021 übernommen.

Alle interessierten Personen, welche Mitglied einer luxemburgischen Organisation sind, können sich kostenlos an der Entwicklung von luxemburgischen (ILNAS), europäischen (CEN, CENELEC) und internationalen (ISO, IEC) Normen beteiligen:

- Inhalt der Normen beeinflussen und mitgestalten
- Künftige Entwicklungen vorhersehen
- An Sitzungen der technischen Komitees teilnehmen

<https://portail-qualite.public.lu/fr/normes-normalisation/participer-normalisation.html>

### **DIESES WERK IST URHEBERRECHTLICH GESCHÜTZT**

Kein Teil dieser Veröffentlichung darf ohne schriftliche Einwilligung weder vervielfältigt noch in sonstiger Weise genutzt werden - sei es elektronisch, mechanisch, durch Fotokopien oder auf andere Art!

Deutsche Fassung

## Futtermittel: Probenahme- und Untersuchungs-verfahren - Nachweis und Zählung von Enterococcus spp. (*E. faecium*) als Futtermittelzusatzstoff

Animal feeding stuffs: Methods of sampling and analysis  
- Detection and enumeration of Enterococcus (*E.*  
*faecium*) spp. used as feed additive

Aliments des animaux: Méthodes d'échantillonnage et  
d'analyse - Détection et dénombrement des souches de  
Enterococcus (*E. faecium*) spp. utilisées comme additifs  
pour l'alimentation animale

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 2. August 2021 angenommen.

Die CEN-Mitglieder sind gehalten, die CEN/CENELEC-Geschäftsordnung zu erfüllen, in der die Bedingungen festgelegt sind, unter denen dieser Europäischen Norm ohne jede Änderung der Status einer nationalen Norm zu geben ist. Auf dem letzten Stand befindliche Listen dieser nationalen Normen mit ihren bibliographischen Angaben sind beim CEN-CENELEC-Management-Zentrum oder bei jedem CEN-Mitglied auf Anfrage erhältlich.

Diese Europäische Norm besteht in drei offiziellen Fassungen (Deutsch, Englisch, Französisch). Eine Fassung in einer anderen Sprache, die von einem CEN-Mitglied in eigener Verantwortung durch Übersetzung in seine Landessprache gemacht und dem Management-Zentrum mitgeteilt worden ist, hat den gleichen Status wie die offiziellen Fassungen.

CEN-Mitglieder sind die nationalen Normungsinstitute von Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, den Niederlanden, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, der Republik Nordmazedonien, Rumänien, Schweden, der Schweiz, Serbien, der Slowakei, Slowenien, Spanien, der Tschechischen Republik, der Türkei, Ungarn, dem Vereinigten Königreich und Zypern.



EUROPÄISCHES KOMITEE FÜR NORMUNG  
EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION  
COMITÉ EUROPÉEN DE NORMALISATION

CEN-CENELEC Management-Zentrum: Rue de la Science 23, B-1040 Brüssel

# Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort .....	3
Einleitung .....	5
1 Anwendungsbereich.....	6
2 Normative Verweisungen .....	6
3 Begriffe .....	6
4 Kurzbeschreibung .....	6
5 Verdünnungslösungen und Nährmedien.....	7
5.1 Verdünnungslösungen.....	7
5.2 Nährmedien .....	8
6 Geräte.....	10
7 Probenahme .....	11
8 Vorbereitung der Untersuchungsprobe .....	11
9 Durchführung.....	12
9.1 Herstellung der Agarplatten für das Oberflächenverfahren .....	12
9.2 Herstellung des Nährmediums für das Nährbodenplattenverfahren .....	12
9.3 Herstellung der Ausgangssuspension und der Dezimalverdünnungen .....	12
9.4 Beimpfung und Bebrütung der Platten .....	14
9.4.1 Allgemeines .....	14
9.4.2 Oberflächenverfahren .....	14
9.4.3 Nährbodenplattenverfahren .....	15
9.5 Zählung der Kolonien.....	15
9.6 Bestätigung .....	15
10 Angabe der Ergebnisse .....	16
11 Präzision .....	16
11.1 Allgemeines .....	16
11.2 Ringversuche.....	16
11.3 Wiederholpräzision.....	17
11.4 Vergleichpräzision .....	17
12 Untersuchungsbericht .....	17
Anhang A (informativ) Anmerkungen zum Verfahren .....	18
A.1 Allgemeines .....	18
A.2 Kritische Kupferkonzentration .....	18
Anhang B (informativ) Ergebnisse der Ringversuche.....	19
B.1 Ringversuch auf Basis von Galle-Äsculin-Azid-Agar .....	19
B.2 Ringversuch auf Basis von Agar nach Slanetz und Bartley.....	19
Literaturhinweise.....	21

## Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (EN 15788:2021) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 327 „Futtermittel — Probenahme- und Untersuchungsverfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von NEN gehalten wird.

Diese Europäische Norm muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis Mai 2022, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Mai 2022 zurückgezogen werden.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. CEN ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

Dieses Dokument ersetzt EN 15788:2009.

Die wesentlichen Änderungen im Vergleich zur Vorgängerausgabe sind folgende:

- Änderung des Titels;
- Erweiterung des Anwendungsbereiches auf alle als Futterzusatzstoff eingesetzten Enterokokken;
- Aktualisierung der normativen Querverweisungen;
- Zusatz von phosphatgepuffertes Salzlösung mit Tween® 80;
- Ergänzung der Möglichkeit, phosphatgepuffertes Salzlösung mit Tween® 80 für die Herstellung der Ausgangssuspension sowie als Verdünnungsmittel für Verdünnungsreihen zu verwenden;
- Zugabe von Agar nach Slanetz und Bartley als selektives Nachweismedium;
- Ersatz des geforderten Labormixers mit einer Drehzahl von 18 000 min<sup>-1</sup> bis 22 000 min<sup>-1</sup> durch Homogenisiergeräte, z. B. nach EN ISO 7218, mit einer maximal geforderten Drehzahl von 10 000 min<sup>-1</sup>;
- Vereinheitlichung der Homogenisierungsdauer für die Herstellung der Ausgangssuspension auf fünf Minuten für alle Futtermittelmatrixen;
- Ergänzung der Möglichkeit des Einsatzes eines Spiralplatters;
- Herstellung der Ausgangssuspension generell mit temperierter tPBS;
- Ergänzung des Nährbodenplattenverfahrens als alternatives Kultivierungsverfahren;
- Ergänzung einer Vorgehensweise zur Untersuchung von Futtermitteln mit hohen Kupfergehalten im informativen Anhang A;
- Ergänzung von Validierungskenndaten von VDLUFA-Ringversuchen mit verschiedenen Futtermittelmatrixen unter Verwendung von Agar nach Slanetz und Bartley als Zählmedien;
- Anpassung des Bereichs der akzeptierten Koloniezahlen für die Zählung von „≥ 30 bis ≤ 350“ auf „≥ 10 bis ≤ 200“ Kolonien je Platte.

Rückmeldungen oder Fragen zu diesem Dokument sollten an das jeweilige nationale Normungsinstitut des Anwenders gerichtet werden. Eine vollständige Liste dieser Institute ist auf den Internetseiten von CEN abrufbar.

Entsprechend der CEN-CENELEC-Geschäftsordnung sind die nationalen Normungsinstitute der folgenden Länder gehalten, diese Europäische Norm zu übernehmen: Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, die Republik Nordmazedonien, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, Niederlande, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, Schweiz, Serbien, Slowakei, Slowenien, Spanien, Tschechische Republik, Türkei, Ungarn, Vereinigtes Königreich und Zypern.

## Einleitung

Das Verfahren wurde zur Zählung von Enterokokken (*E. faecium*) entwickelt, die als Futtermittelzusatzstoffe verwendet werden, um die Europäische Kommission zu befähigen, die korrekte Kennzeichnung von Futtermitteln zu überwachen. Es wurde erstmals im Rahmen des EU-Projekts SMT4-CT98-2235 „Methods for the official control of probiotics used as feed additives“ [1] erstellt. Es wurde um ein zweites Medium aus der VDLUFA-Methode 28.2.3 „Bestimmung von *Enterococcus faecium*“ [2] ergänzt. Das Verfahren beruht auf einer umfassenden Prüfung von 12 vorher ausgewählten, handelsüblich verfügbaren Medien für den Nachweis und die Zählung von Enterokokken. Das festgelegte Verfahren wurde in Ringversuchen für *E. faecium* ([1] [2] [3]) validiert. Es kann davon ausgegangen werden, dass das Verfahren auch für andere *Enterococcus* spp. geeignet ist.

Dieses Verfahren ist für Enterokokken (*E. faecium*), die als Futtermittelzusatzstoffe verwendet werden, nicht selektiv, es kann jedoch zur Zählung von *Enterococcus* spp. in Zusatzstoffen, Vormischungen und Mischfuttermitteln in der Annahme angewendet werden, dass die zugesetzten Enterokokken (*E. faecium*) in einer weit höheren Anzahl vorhanden sind als alle anderen Enterokokken.

Dieses Verfahren ist nicht für den Nachweis von ubiquitären oder fäkalen Kontaminanten von *Enterococcus* spp. aus Lebensmitteln und Futtermitteln einsetzbar.

## 1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt allgemeine Regeln für die Zählung von Enterokokken (*E. faecium*) in Futtermitteln (Zusatzstoffe, Vormischungen und Mischfuttermittel mit Ausnahme von mineralischen Futtermitteln) fest, die Enterokokken als einzelnen mikrobiellen Bestandteil oder in einem Gemisch mit anderen Mikroorganismen enthalten. Die Anwendung des Verfahrens auf Vormischungen und Mischfuttermittel mit kritischen Kupfermengen erfordert ein besonderes Vorgehen (siehe A.2). Dieses Dokument ist nicht anwendbar auf mineralische Futtermittel, die als Ergänzungsfuttermittel definiert sind, die hauptsächlich aus Mineralstoffen zusammengesetzt sind und mindestens 40 % Rohasche enthalten (Verordnung (EG) Nr. 767/2009) [4].

Es gibt unterschiedliche Kategorien von Futtermittelproben:

- a) Zusatzstoffe, die etwa  $10^{10}$  koloniebildende Einheiten (KbE/g) enthalten;
- b) Vormischungen, die etwa  $10^{11}$  KbE/kg enthalten;
- c) Mischfuttermittel, Mehle oder Pellets, die etwa  $10^9$  KbE/kg enthalten.

## 2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente werden im Text in solcher Weise in Bezug genommen, dass einige Teile davon oder ihr gesamter Inhalt Anforderungen des vorliegenden Dokuments darstellen. Bei datierten Verweisungen gilt nur die in Bezug genommene Ausgabe. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe des in Bezug genommenen Dokuments (einschließlich aller Änderungen).

EN ISO 6498, *Futtermittel — Leitfaden für die Probenvorbereitung* (ISO 6498)

## 3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

ISO und IEC stellen terminologische Datenbanken für die Verwendung in der Normung unter den folgenden Adressen bereit:

- ISO Online Browsing Platform: verfügbar unter <https://www.iso.org/obp>
- IEC Electropedia: verfügbar unter <https://www.electropedia.org/>

### 3.1

#### **Enterokokken**

grampositive, Katalase-negative Kokken, die meist paarweise oder kurzkettig auftreten

Anmerkung 1 zum Begriff: Diese Beschreibung basiert auf den Eigenschaften, wie sie in diesem Dokument definiert werden.

Anmerkung 2 zum Begriff: Enterokokken werden als aerotolerante Anaerobier mit der Fähigkeit eingestuft, 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid zu Formazan zu reduzieren und Äsculin bei  $44\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$  zu hydrolysieren. Enterokokken bilden Kolonien, die der Beschreibung dieser Art auf den festgelegten Nährmedien nach der Bebrütung von 24 h bzw. 48 h bei einer Temperatur von  $37\text{ °C}$  unter aeroben Bedingungen entsprechen (siehe 9.6).

## 4 Kurzbeschreibung

- a) Herstellung von sterilen und vorgetrockneten Nährbodenagarplatten oder Herstellung eines sterilen flüssigen Nährmediums, das auf  $44\text{ °C}$  bis  $47\text{ °C}$  temperiert ist;