

ILNAS

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

ILNAS-EN 15788:2021

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

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

11/2021



Avant-propos national

Cette Norme Européenne EN 15788:2021 a été adoptée comme Norme Luxembourgeoise ILNAS-EN 15788:2021.

Toute personne intéressée, membre d'une organisation basée au Luxembourg, peut participer gratuitement à l'élaboration de normes luxembourgeoises (ILNAS), européennes (CEN, CENELEC) et internationales (ISO, IEC) :

- Influencer et participer à la conception de normes
- Anticiper les développements futurs
- Participer aux réunions des comités techniques

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

CETTE PUBLICATION EST PROTÉGÉE PAR LE DROIT D'AUTEUR

Aucun contenu de la présente publication ne peut être reproduit ou utilisé sous quelque forme ou par quelque procédé que ce soit - électronique, mécanique, photocopie ou par d'autres moyens sans autorisation préalable !

Version Française

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

Futtermittel: Probenahme- und Untersuchungsverfahren - 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

La présente Norme européenne a été adoptée par le CEN le 2 août 2021.

Les membres du CEN sont tenus de se soumettre au Règlement Intérieur du CEN/CENELEC, qui définit les conditions dans lesquelles doit être attribué, sans modification, le statut de norme nationale à la Norme européenne. Les listes mises à jour et les références bibliographiques relatives à ces normes nationales peuvent être obtenues auprès du Centre de Gestion du CEN-CENELEC ou auprès des membres du CEN.

La présente Norme européenne existe en trois versions officielles (allemand, anglais, français). Une version dans une autre langue faite par traduction sous la responsabilité d'un membre du CEN dans sa langue nationale et notifiée au Centre de Gestion du CEN-CENELEC, a le même statut que les versions officielles.

Les membres du CEN sont les organismes nationaux de normalisation des pays suivants: Allemagne, Autriche, Belgique, Bulgarie, Chypre, Croatie, Danemark, Espagne, Estonie, Finlande, France, Grèce, Hongrie, Irlande, Islande, Italie, Lettonie, Lituanie, Luxembourg, Malte, Norvège, Pays-Bas, Pologne, Portugal, République de Macédoine du Nord, République de Serbie, République Tchèque, Roumanie, Royaume-Uni, Slovaquie, Slovénie, Suède, Suisse et Turquie.



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

CEN-CENELEC Management Centre: Rue de la Science 23, B-1040 Bruxelles

Sommaire

	Page
Avant-propos européen	3
Introduction	5
1 Domaine d'application	6
2 Références normatives	6
3 Termes et définitions.....	6
4 Principe.....	7
5 Diluants et milieux de culture	7
5.1 Diluants.....	7
5.2 Milieux de culture	8
6 Appareillage.....	10
7 Échantillonnage	11
8 Préparation de l'échantillon d'essai.....	11
9 Mode opératoire.....	12
9.1 Préparation des boîtes de gélose coulée pour la méthode d'ensemencement en surface.....	12
9.2 Préparation des milieux de culture pour la méthode d'ensemencement en profondeur	12
9.3 Préparation de la suspension mère et des dilutions décimales.....	12
9.4 Ensemencement et incubation des boîtes.....	14
9.5 Dénombrement des colonies	15
9.6 Confirmation.....	15
10 Expression des résultats.....	16
11 Fidélité	17
11.1 Généralités.....	17
11.2 Études interlaboratoires	17
11.3 Répétabilité.....	17
11.4 Reproductibilité	17
12 Rapport d'essai	17
Annexe A (informative) Notes relatives au mode opératoire	19
A.1 Généralités.....	19
A.2 Teneur critique en cuivre.....	19
Annexe B (informative) Résultats des études interlaboratoires	20
B.1 Étude interlaboratoires fondée sur la gélose bile-esculine-azide.....	20
B.2 Étude interlaboratoires fondée sur la gélose de Slanetz et Bartley.....	20
Bibliographie	22

Avant-propos européen

Le présent document (EN 15788:2021) a été élaboré par le Comité technique CEN/TC 327 « Aliments des animaux — Méthodes d'échantillonnage et d'analyse », dont le secrétariat est tenu par NEN.

Cette Norme européenne devra recevoir le statut de norme nationale, soit par publication d'un texte identique, soit par entérinement, au plus tard en mai 2022, et toutes les normes nationales en contradiction devront être retirées au plus tard en mai 2022.

L'attention est appelée sur le fait que certains des éléments du présent document peuvent faire l'objet de droits de propriété intellectuelle ou de droits analogues. Le CEN ne saurait être tenu pour responsable de ne pas avoir identifié de tels droits de propriété et averti de leur existence.

Le présent document remplace l'EN 15788:2009.

Les principaux changements apportés à l'édition précédente sont les suivants :

- modification du titre ;
- extension du domaine d'application à toutes les souches d'*Enterococci* utilisées comme additifs pour l'alimentation animale ;
- mise à jour des références normatives croisées ;
- ajout de Tween® 80 dans le tampon phosphate ;
- ajout de l'option permettant d'utiliser un tampon phosphate supplémenté avec du Tween® 80 pour la préparation de la suspension mère, ainsi que comme diluant pour les dilutions successives ;
- ajout de la gélose de Slanetz et Bartley comme milieu sélectif pour la détection ;
- remplacement du mélangeur de laboratoire d'une vitesse de rotation de 18 000 min⁻¹ à 22 000 min⁻¹ par des homogénéisateurs, par exemple conformément à l'EN ISO 7218, d'une vitesse de rotation de 10 000 min⁻¹ ;
- uniformisation de la durée d'homogénéisation pour la préparation des suspensions mères à cinq minutes quelle que soit la matrice ;
- ajout de l'option permettant d'utiliser un ensemencement spiral pour l'ensemencement ;
- préparation des suspensions mères généralement réalisée à l'aide de tPBS tempéré ;
- ajout de la méthode d'ensemencement en profondeur comme technique alternative de culture ;
- ajout d'un mode opératoire pour l'étude d'aliments pour animaux contenant une quantité élevée de cuivre dans l'Annexe A informative ;
- ajout des données de validation issues des essais interlaboratoires de la VDLUFA sur différentes matrices d'aliments pour animaux au moyen de la gélose de Slanetz et Bartley comme milieu de dénombrement ;

- ajustement de la plage de nombres acceptés de colonies pour le comptage de « ≥ 30 à ≤ 350 » à « ≥ 10 à ≤ 200 » colonies par boîte.

Il convient que l'utilisateur adresse tout retour d'information et toute question concernant le présent document à l'organisme national de normalisation de son pays. Une liste exhaustive desdits organismes se trouve sur le site web du CEN.

Selon le Règlement Intérieur du CEN/CENELEC, les instituts de normalisation nationaux des pays suivants sont tenus de mettre cette Norme européenne en application : Allemagne, Autriche, Belgique, Bulgarie, Chypre, Croatie, Danemark, Espagne, Estonie, Finlande, France, Grèce, Hongrie, Irlande, Islande, Italie, Lettonie, Lituanie, Luxembourg, Malte, Norvège, Pays-Bas, Pologne, Portugal, République de Macédoine du Nord, République tchèque, Roumanie, Royaume-Uni, Serbie, Slovaquie, Slovénie, Suède, Suisse et Turquie.

Introduction

La présente méthodologie a été mise au point en vue de dénombrer les entérocoques (*E. faecium*) utilisés comme additifs dans l'alimentation animale, afin de permettre à la Commission européenne de s'assurer du bon étiquetage des produits destinés aux aliments pour animaux. Elle a été élaborée dans un premier temps à partir des données recueillies lors du Projet UE SMT4-CT98-2235 « Methods for the official control of probiotics used as feed additives » [1]. Elle a été modifiée pour prendre en compte un second milieu tiré de la méthode 28.2.3 de la VDLUFA (l'association allemande des instituts de recherches et d'analyses agricoles), « Enumeration of *Enterococcus faecium* » [2]. La méthode est basée sur une large sélection de 12 milieux présélectionnés et disponibles dans le commerce pour la détection et le dénombrement des entérocoques. La méthodologie spécifiée a été validée dans le cadre d'études interlaboratoires portant sur *E. faecium* ([1], [2], [3]). Il peut être pris pour hypothèse que la méthode est également appropriée pour d'autres *Enterococcus* spp.

La présente méthode n'est pas sélective pour les entérocoques (*E. faecium*) utilisés comme additifs dans l'alimentation animale, mais peut être appliquée pour le dénombrement des *Enterococcus* spp. dans les additifs, les prémélanges et les aliments composés pour animaux en prenant pour hypothèse que les entérocoques ajoutés (*E. faecium*) sont présents en nombre bien plus important que tout autre entérocoque.

Cette méthode n'est pas applicable à la détection de n'importe quelle souche de *Enterococcus* spp. fécale ou ubiquitaire dans les aliments qu'ils soient destinés aux animaux ou aux humains.

1 Domaine d'application

Le présent document spécifie des règles générales pour le dénombrement d'entérocoques (*E. Faecium*) présents dans les aliments pour animaux (additifs, prémélanges et aliments composés, à l'exception des aliments minéraux) qui contiennent des entérocoques comme seul micro-organisme constitutif ou en mélange avec d'autres micro-organismes. L'application de la méthode aux prémélanges et aux aliments composés pour animaux présentant une teneur critique en cuivre nécessite de mettre en œuvre un mode opératoire spécial (voir Annexe A.2). Le présent document ne s'applique pas aux aliments minéraux, qui se définissent comme des aliments complémentaires constitués principalement de minéraux et contenant au moins 40 % de cendre brute (Règlement (CE) 767/2009) [4].

Il existe différentes catégories d'échantillons d'aliments pour animaux :

- a) les additifs contenant environ 10^{10} UFC/g (UFC : unités formant colonie) ;
- b) les prémélanges contenant 10^{11} UFC/kg ;
- c) les aliments composés, farines ou granulés contenant environ 10^9 UFC/kg.

2 Références normatives

Les documents suivants cités dans le texte constituent, pour tout ou partie de leur contenu, des exigences du présent document. Pour les références datées, seule l'édition citée s'applique. Pour les références non datées, la dernière édition du document de référence s'applique (y compris les éventuels amendements).

EN ISO 6498, *Aliments des animaux — Lignes directrices pour la préparation des échantillons (ISO 6498)*

3 Termes et définitions

Pour les besoins du présent document, les termes et définitions suivants s'appliquent.

L'ISO et l'IEC tiennent à jour des bases de données terminologiques destinées à être utilisées en normalisation, consultables aux adresses suivantes :

- ISO Online browsing platform : disponible à l'adresse <https://www.iso.org/obp>
- IEC Electropedia : disponible à l'adresse <https://www.electropedia.org/>

3.1

entérocoques

coques catalase négatives, à Gram positif qui apparaissent généralement par paires ou en chaînes courtes

Note 1 à l'article : Cette description est fondée sur les caractéristiques de ces micro-organismes utilisées dans le cadre du présent document.

Note 2 à l'article : Les entérocoques appartiennent à la classe des micro-organismes anaérobies aérotolérants en mesure de réduire le chlorure de 2,3,5-triphényltétrazolium en formazan et d'hydrolyser l'esculine à $44 \text{ °C} \pm 0,5 \text{ °C}$. Ils forment des colonies correspondant à la description de cette espèce dans les milieux de culture spécifiés après incubation à une température de 37 °C dans des conditions aérobies pendant 24 h ou 48 h (voir 9.6).