

Deutsche Fassung

Futtermittel: Probenahme- und Untersuchungsverfahren - PFGE Typisierung von Laktobazillen, Pediokokken, Enterokokken und Bazillen in Futtermitteln

Animal feeding stuffs - Methods of sampling and
analysis - PFGE typing of Lactobacilli, Pediococci,
Enterococci and Bacilli in animal feeds

Aliments des animaux : Méthodes d'analyse - Typage
EGCP des lactobacilles, pédiocoques, entérocoques et
bacilles dans les aliments des animaux

Diese Technische Spezifikation (CEN/TS) wurde vom CEN am 10. März 2023 als eine künftige Norm zur vorläufigen Anwendung angenommen.

Die Gültigkeitsdauer dieser CEN/TS ist zunächst auf drei Jahre begrenzt. Nach zwei Jahren werden die Mitglieder des CEN gebeten, ihre Stellungnahmen abzugeben, insbesondere über die Frage, ob die CEN/TS in eine Europäische Norm umgewandelt werden kann.

Die CEN Mitglieder sind verpflichtet, das Vorhandensein dieser CEN/TS in der gleichen Weise wie bei einer EN anzukündigen und die CEN/TS verfügbar zu machen. Es ist zulässig, entgegenstehende nationale Normen bis zur Entscheidung über eine mögliche Umwandlung der CEN/TS in eine EN (parallel zur CEN/TS) beizubehalten.

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	4
1 Anwendungsbereich.....	5
2 Normative Verweisungen	5
3 Begriffe	5
4 Kurzbeschreibung	6
5 Reagenzien	6
6 Medien	8
7 Geräte.....	8
8 Durchführung.....	9
9 Untersuchungsbericht	13
Anhang A (informativ) Zusammenfassung des Ringversuchs.....	14
A.1 Allgemeines	14
A.2 Ringversuch	14
Literaturhinweise.....	16

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (CEN/TS 17697:2023) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 327 „Futtermittel — Probenahme- und Untersuchungsverfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von NEN gehalten wird.

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 wurde im Rahmen eines Normungsauftrages erarbeitet, der die Europäische Kommission und die Europäische Freihandelsassoziation CEN erteilt haben.

Rückmeldungen und 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 Technische Spezifikation anzukündigen: 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

DNA-Fingerprinting (Bestimmung des genetischen Fingerabdrucks) mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) ermöglicht den Vergleich von großen Restriktionsfragmenten, die größer als 50 kbp sind. Diese Technik in Kombination mit der Restriktion des DNA-Moleküls durch selten schneidende Endonucleasen (die Sequenzen von 6 oder 8 Basenpaaren erkennen) wurde erfolgreich auf die Stammtypisierung verschiedener Milchsäurebakterien einschließlich Laktobazillen und Pediokokken angewendet.

Dieses Protokoll beschreibt die Vorbereitung von genomischer DNA für die Pulsfeld-Gelelektrophorese und weitere Einzelheiten des Verfahrens der PFGE-Typisierung.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt eine Methodik der Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) zur Identifizierung zugelassener probiotischer Lactobacillus-, Pediococcus-, Enterococcus- und Bacillus-Stämme fest. Das Verfahren kann auf gereinigte Kolonien angewendet werden, die aus kultivierten Vormischungen und Futtermitteln gewonnen werden. Das Verfahren kann sogar vor einem signifikanten mikrobiologischen Hintergrund angewendet werden, um das Vorhandensein von Mikroorganismen (Stämme und deklarierte Konzentrationen), die als Futtermittelzusatzstoffe verwendet werden, zu verifizieren.

2 Normative Verweisungen

Es gibt keine normativen Verweisungen in diesem Dokument.

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

Bazillen

beliebige von verschiedenen stäbchenförmigen, sporenbildenden Bakterien der Familie Bacillaceae

3.2

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. Sie 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 °C unter aeroben Bedingungen entsprechen.

Anmerkung 3 zum Begriff: Siehe EN 15788:2021, 9.6 zu den Eigenschaften dieser Kolonien nach einer Bebrütungsdauer von 24 h bis 48 h bei einer Temperatur von 37 °C unter aeroben Bedingungen und auf einem geeigneten Medium.

[QUELLE: EN 15788:2021, 3.1, modifiziert – Anmerkung 3 zum Begriff hinzugefügt]

3.3

Laktobazillen

grampositive, Katalase-negative, stäbchenförmige, in Ketten angeordnete Bakterien

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

Anmerkung 2 zum Begriff: Laktobazillen bilden Kolonien, die der Beschreibung dieser Arten auf den festgelegten selektiven Nährmedien nach einer Bebrütungsdauer von 48 h bis 72 h bei einer Temperatur von 37 °C unter anaeroben Bedingungen entsprechen.

Anmerkung 3 zum Begriff: Siehe EN 15787:2021, 9.7 zu den Eigenschaften dieser Kolonien nach einer Bebrütungs-dauer von 48 h bis 72 h bei einer Temperatur von 37 °C unter anaeroben Bedingungen und auf einem geeigneten Medium.

[QUELLE: EN 15787:2021, 3.1, modifiziert – Anmerkung 3 zum Begriff hinzugefügt]

3.4

Pediokokken

grampositive, Katalase negative unbewegliche Kokken, die sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen wachsen

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

Anmerkung 2 zum Begriff: Pediokokken treten meist in Paaren oder Tetraden auf, selten in Ketten oder einzeln, und teilen sich entlang zweier Symmetrieebenen. Sie bilden Kolonien, die der Beschreibung dieser Arten auf den festgelegten selektiven Nährmedien nach einer Bebrütungs-dauer von 48 h bis 72 h bei einer Temperatur von 37 °C unter aeroben oder anaeroben Bedingungen entsprechen.

Anmerkung 3 zum Begriff: Siehe EN 15786:2021, 9.7 für die Eigenschaften dieser Kolonien nach einer Bebrütungs-dauer von 48 h bis 72 h bei einer Temperatur von 37 °C unter anaeroben und aeroben Bedingungen und auf einem geeigneten Medium.

[QUELLE: EN 15786:2021, 3.1, modifiziert – Anmerkung 3 zum Begriff hinzugefügt]

4 Kurzbeschreibung

Nach der Kultur auf den geeigneten Medien werden einzelne Kolonien ausgewählt (siehe das in den CEN-Verfahren 7, 8, 9, 10 beschriebene Verfahren für die Zählung). Diese Kolonien werden über Nacht bei 37 °C in 10 ml Flüssigkulturen kultiviert. Nach der Bebrütung wird die Flüssigkultur zentrifugiert. Das Bakterien-Pellet wird wieder aufgelöst (TE), die Zellen werden lysiert und die chromosomale DNA wird in Agarblöckchen platziert.

Die chromosomale DNA wird mittels Restriktionsenzymen in spezifische Fragmente zerlegt, und die erhaltenen Fragmente werden separiert und nach der PFGE auf Gel sichtbar gemacht.

Genomische DNA wurde durch Modifizierung und Anpassung bekannter, zuvor für Laktobazillen und Pediokokken (1, 2, 3, 5) und für Enterokokken und Bazillen (4,6) beschriebener Verfahren für PFGE vorbereitet.

Das Verfahren wurde im Rahmen des EU-Forschungsvertrags Nr. SMT4-CT98-2235 („Methods for the Official Control of Probiotics Used as Feed Additives“ [Verfahren für die amtliche Untersuchung von Probiotika, die als Futtermittelzusatzstoffe eingesetzt werden]) entwickelt und beurteilt.

Das Verfahren wurde während des Ringversuchs weiter optimiert und vollständig validiert. Eine Zusammenfassung des Ringversuchs kann Anhang A „Ergebnisse des Ringversuchs“ entnommen werden.

5 Reagenzien

5.1 Tris(hydroxymethyl)aminomethan-Hydrochlorid (Tris-HCl)

5.2 Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)

5.3 Tris-HCl TE 10 mmol Tris-Hcl, 1 mmol EDTA, wird auf pH-Wert 8,0 eingestellt und autoklaviert