

DIN EN 15788

ICS 65.120

EntwurfEinsprüche bis 2020-03-17
Vorgesehen als Ersatz für
DIN EN 15788:2009-12**Futtermittel: Probenahme- und Untersuchungsverfahren –
Trennung und Zählung von Enterococcus spp. (E. faecium);
Deutsche und Englische Fassung prEN 15788:2019**

Animal feeding stuffs: Methods of sampling and analysis –
Isolation and enumeration of Enterococcus (E. faecium) spp.;
German and English version prEN 15788:2019

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2020-01-17 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und
Stellungnahme vorgelegt.

Weil die beabsichtigte Norm von der vorliegenden Fassung abweichen kann, ist die Anwendung dieses Entwurfs
besonders zu vereinbaren.

Stellungnahmen werden erbeten

- vorzugsweise online im Norm-Entwurfs-Portal von DIN unter www.din.de/go/entwuerfe bzw. für Norm-Entwürfe der DKE auch im Norm-Entwurfs-Portal der DKE unter www.entwuerfe.normenbibliothek.de, sofern dort wiedergegeben;
- oder als Datei per E-Mail an nal@din.de möglichst in Form einer Tabelle. Die Vorlage dieser Tabelle kann im Internet unter www.din.de/go/stellungnahmen-norm-entwuerfe oder für Stellungnahmen zu Norm-Entwürfen der DKE unter www.dke.de/stellungnahme abgerufen werden;
- oder in Papierform an den DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL), 10772 Berlin, Saatwinkler Damm 42/43, 13627 Berlin.

Die Empfänger dieses Norm-Entwurfs werden gebeten, mit ihren Kommentaren jegliche relevanten
Patentrechte, die sie kennen, mitzuteilen und unterstützende Dokumentationen zur Verfügung zu stellen.

Gesamtumfang 44 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN 15788:2019) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 327 „Futtermittel — Probenahme- und Untersuchungsverfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von NEN (Niederlande) gehalten wird.

Das zuständige deutsche Normungsgremium ist der Arbeitsausschuss NA 057-03-03 AA „Futtermittel“ im DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL).

Um Zweifelsfälle in der Übersetzung auszuschließen, ist die englische Originalfassung beigelegt. Die Nutzungsbedingungen für den deutschen Text des Norm-Entwurfes gelten gleichermaßen auch für den englischen Text.

Für die in diesem Dokument zitierten internationalen Dokumente wird im Folgenden auf die entsprechenden deutschen Dokumente hingewiesen:

ISO 5725-2 siehe DIN ISO 5725-2

Änderungen

Gegenüber DIN EN 15788:2009-12 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) Norm bei der Überarbeitung des Verfahrens an das VDLUFA-Verfahren 28.2.3 „Zählung von *Enterococcus faecium*“ angepasst und mit Validierungsdaten aus Ringversuchen ergänzt;
- b) Aufnahme von „kritischen Kupferkonzentrationen“ in Anhang A (Verfahren ist in der VDLUFA-Methode 28.2.3 beschrieben und validiert);
- c) Norm redaktionell überarbeitet und den derzeit gültigen Gestaltungsregeln angepasst.

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN ISO 5725-2, *Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Messverfahren und Messergebnissen — Teil 2: Grundlegende Methode für die Ermittlung der Wiederhol- und Vergleichpräzision eines vereinheitlichten Messverfahrens*

Futtermittel: Probenahme- und Untersuchungsverfahren — Trennung und Zählung von *Enterococcus* spp. (*E. faecium*)

*Animal feeding stuffs: Methods of sampling and analysis — Isolation and enumeration of *Enterococcus* (*E. faecium*) spp.*

ICS:

Deskriptoren

Dokument-Typ: Europäische Norm
Dokument-Untertyp:
Dokument-Stage: CEN-Umfrage
Dokument-Sprache: D

STD Version 2.9p

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort.....	3
Einleitung	4
1 Anwendungsbereich.....	5
2 Normative Verweisungen	5
3 Begriffe	5
4 Kurzbeschreibung.....	6
5 Verdünnungslösungen und selektive Nährmedien.....	6
6 Geräte.....	9
7 Probenahme.....	10
8 Vorbereitung der Untersuchungsprobe.....	10
9 Durchführung	11
9.1 Herstellung der Agarplatten	11
9.2 Herstellung des selektiven Nährmediums für das Gussplattenverfahren.....	11
9.3 Herstellung der Erstverdünnung und der Dezimalverdünnungen	11
9.4 Beimpfung und Bebrütung der Platten	13
9.5 Zählung der Kolonien	13
9.6 Bestätigung.....	14
10 Auswertung.....	15
11 Präzision	15
11.1 Allgemeines.....	15
11.2 Ringversuche	15
11.3 Wiederholpräzision.....	16
11.4 Vergleichpräzision.....	16
12 Untersuchungsbericht.....	16
Anhang A (informativ) Anmerkungen zum Verfahren	17
Anhang B (informativ) Ergebnisse der Ringversuche.....	18
Literaturhinweise	21

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN 15788:2019) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 327 „Futtermittel – Probenahme- und Untersuchungsverfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von NEN gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur CEN-Umfrage vorgelegt.

Dieses Dokument wird EN 15788:2009 ersetzen.

Einleitung

Diese Methodik wurde zur Zählung von Enterokokken (*E. faecium*) als Futtermittelzusatzstoffe entwickelt, um die Europäische Kommission zu befähigen, die korrekte Kennzeichnung von Futtermittelprodukten zu überwachen (EU-Projekt SMT4-CT98-2235 – „Methods for the official control of probiotics (microorganisms) used as animal feeds“) [1]. Sie wurde durch ein zweites Nährmedium und Validierungsdaten aus der VDLUFA-Methode 28.2.3 „Bestimmung von *Enterococcus faecium*“ [7] ergänzt. Das Verfahren beruht auf einer umfassenden Prüfung von 12 vorher ausgewählten, handelsüblich verfügbaren Nährmedien für die Bestimmung und Zählung von Enterokokken. Die beschriebene Methodik wurde in Ringversuchen für *Enterococcus faecium* bestätigt. Es kann davon ausgegangen werden, dass das Verfahren auch für andere *Enterococcus* spp. geeignet ist.

Dieses Verfahren ist nicht selektiv für Enterokokken (*E. faecium*) als Futtermittelzusatzstoffe, es kann jedoch angewendet werden, um Enterokokken in Zusatzstoffen, Vormischungen und Mischfuttermitteln zu zählen, vorausgesetzt, dass die hinzugefügten Enterokokken (*E. faecium*) in einer höheren Anzahl als alle anderen Enterokokken vorhanden sind.

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 Mischfuttermittel mit kritischen Kupfermengen erfordert ein besonderes Verfahren (siehe Anhang A). Dieses Dokument ist nicht anwendbar auf mineralische Futtermittel, die als Ergänzungsfuttermittel definiert sind, welche hauptsächlich aus Mineralstoffen zusammengesetzt sind und mindestens 40 % Rohasche enthalten (Verordnung R767/2009) [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, Mehl oder Pellets, die etwa 10^9 KbE/kg enthalten.

Die Nachweisgrenze entspricht der in EN ISO 7218 festgelegten.

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)*

EN ISO 7218, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Allgemeine Anforderungen und Leitlinien für mikrobiologische Untersuchungen (ISO 7218)*

EN ISO 6887-1, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Vorbereitung von Untersuchungsproben und Herstellung von Erstverdünnungen und von Dezimalverdünnungen für mikrobiologische Untersuchungen — Teil 1: Allgemeine Regeln für die Herstellung von Erstverdünnungen und Dezimalverdünnungen (ISO 6887-1)*

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:

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

3.1

Enterococcus faecium

grampositiver, Katalase-negativer Coccus, der meist paarweise oder kurzkettig auftritt

Anmerkung 1 zum Begriff: Diese Beschreibung basiert auf den Eigenschaften, wie sie in dieser Norm eingesetzt werden.

Anmerkung 2 zum Begriff: *Enterococcus faecium* wird als aerotoleranter 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. Es bildet Kolonien, die der Beschreibung dieser Art auf den festgelegten selektiven Nährmedien nach der Bebrütung von 24 h bzw. 48 h bei einer Temperatur von 37 °C unter aeroben Bedingungen entsprechen (siehe 9.6).

4 Kurzbeschreibung

- a) Herstellung von sterilen und trockenen Agarplatten oder Herstellung eines sterilen flüssigen selektiven Nährmediums, das auf 44 °C bis 47 °C temperiert ist;
- b) eine repräsentative Untersuchungsprobe wird unter aseptischen Bedingungen entnommen;
- c) eine Erstverdünnung wird mit einer temperierten Verdünnungslösung hergestellt, um eine homogene Verteilung der Enterokokken-Zellen aus der Teilprobe zu erhalten;
- d) die Anzahl der Mikroorganismen je Volumeneinheit wird durch die Herstellung weiterer Dezimalverdünnungen aus der Erstverdünnung reduziert, um eine zählbare Anzahl von Kolonien auf den Zählmedien zu erhalten;
- e) Beimpfen der vorbereiteten gegossenen Platten mit einem Aliquot der optimalen Verdünnungen und Verteilung der Impfkultur mit einem sterilen Ausstrichspatel oder Beimpfen der leeren Petrischalen mit einem Aliquot der optimalen Verdünnungen und Einfüllen des geschmolzenen Agarmediums in die Petrischalen, Mischen und Verfestigen;
- f) die beimpften Platten werden für 24 h bzw. 48 h bei 37 °C ± 1 °C unter aeroben Bedingungen bebrütet;
- g) Zählung der typischen Kolonien unter Beachtung der in 3.1 aufgelisteten typischen Eigenschaften von *Enterococcus faecium*;
- h) morphologische Verifizierung von Isolaten mittels Mikroskopie oder biochemischer Bestätigung, falls erforderlich;
- i) Berechnung der koloniebildenden Einheiten von *Enterococcus faecium* je g oder kg der Futtermittelprobe.

5 Verdünnungslösungen und selektive Nährmedien

5.1 Verdünnungslösungen

5.1.1 Verdünnungslösung für die Erstverdünnung

Diese Verdünnungslösung wird zur Herstellung der Erstverdünnung verwendet und darf auch zur Herstellung weiterer Dezimalverdünnungen verwendet werden.

**Tabelle 1 — Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS, en: phosphate buffered saline),
ergänzt mit Tween®¹ 80 (tPBS)**

Natriumchlorid	NaCl	8,00 g
Kaliumchlorid	KCl	0,20 g
Dinatriumhydrogenphosphat, wasserfrei	Na ₂ HPO ₄	1,15 g
Kaliumdihydrogenphosphat, wasserfrei	KH ₂ PO ₄	0,20 g
Polyoxyethylensorbitanmonooleat (Tween® 80)		1 ml
Wasser, destilliert oder deionisiert		1 000 ml

1 Tween® ist ein Beispiel eines geeigneten, im Handel erhältlichen Produkts. Diese Information dient lediglich zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch CEN.

Die Bestandteile werden in Wasser aufgelöst. Falls erforderlich, wird der endgültige pH-Wert so eingestellt, dass er nach dem Sterilisieren bei 25 °C $7,3 \pm 0,2$ beträgt. Die Lösung wird in geeignete Behälter (z. B. Flaschen oder Kolben, Kulturröhrchen) gefüllt und 15 min lang bei $121\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ sterilisiert. Um einen Verlust während des Autoklavierens zu verhindern, werden Flaschen mit Schraubverschluss empfohlen.

Direkt vor dem Gebrauch wird die Lösung in einem Wasserbad oder Brutschrank auf $40\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ temperiert.

ANMERKUNG Die Verwendung von im Handel erhältlichen PBS-Puffertabletten ist akzeptabel. Es ist jedoch zu beachten, dass es zwischen Produkten verschiedener Hersteller zu Abweichungen in der Zusammensetzung und im pH-Wert kommen kann, sodass die mit ihnen erreichten Ergebnisse sich von denen unterscheiden könnten, die mit dem in dieser Internationalen Norm festgelegten Nährmedium erzielt wurden.

5.1.2 Verdünnungslösungen für Verdünnungsreihen

Für Verdünnungsreihen kann die Verdünnungslösung für die Erstverdünnung (5.1.1) oder alternativ die Pepton-Salzlösung (PSS, en: peptone salt solution) nach EN ISO 6887-1 verwendet werden.

Tabelle 2 — Pepton-Salzlösung PSS nach EN ISO 6887-1

Casein, enzymatisch verdaut	1,0 g
Natriumchlorid (NaCl)	8,5 g
Wasser, destilliert oder deionisiert	1 000 ml

Die Bestandteile werden im Wasser in Kolben, Flaschen oder Kulturröhrchen aufgelöst. Falls erforderlich, wird der pH-Wert so eingestellt, dass er nach dem Sterilisieren bei 25 °C $7,0 \pm 0,2$ beträgt. Für die Dezimalverdünnungen werden Kulturröhrchen, die 9,0 ml $\pm 0,1$ ml nach dem Sterilisieren enthalten, hergestellt, oder es werden Flaschen mit Schraubverschluss verwendet, um einen Gewichtsverlust während des Autoklavierens zu vermeiden. Für 15 min wird bei $121\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ sterilisiert. Die Verdünnungslösung wird auf Raumtemperatur gebracht, bevor sie verwendet wird.

ANMERKUNG Im Handel erhältliche, gebrauchsfertige PSS-Röhrchen mit 9 ml sind geeignet.

5.2 Zählmedien

5.2.1 Allgemeines

Zwei unterschiedliche Nährmedien werden vorgeschlagen:

- a) Galle-Äsculin-Azid-Agar;
- b) Enterococcus-selektives Nährmedium nach Slanetz und Bartley.

ANMERKUNG Beide Nährmedien können sowohl für das Spatelplattenverfahren als auch für das Gussplattenverfahren verwendet werden.

WARNUNG — Die beschriebenen selektiven Nährmedien enthalten Natriumazid. Da es sich bei diesem Stoff um einen hochgiftigen und mutagenen Stoff handelt, müssen Vorsichtsmaßnahmen getroffen werden, um einen Kontakt mit ihm zu vermeiden, insbesondere durch Einatmen von Feinstaub bei der Herstellung von im Handel erhältlichen dehydrierten Vollmedien.

Für eine gleichmäßige Darstellung der Ergebnisse werden bei der Herstellung von Medien entweder ein dehydriertes Vollmedium oder Bestandteile einheitlicher Qualität und Chemikalien von anerkannter Analysenreinheit verwendet.

5.2.2 Zusammensetzung

5.2.2.1 Galle-Äsculin-Azid-Agar

Tabelle 3 — Zusammensetzung von Agar

Caseinpepton (Trypton)		17,0 g
Hefeextrakt		5,0 g
Pepton		3,0 g
Ochsengalle, getrocknet		10,0 g
Natriumchlorid	NaCl	5,0 g
Äsculin		1,0 g
Ammoniumeisen(III)-citrat	$C_6H_8O_7FeNH_3$	0,5 g
Natriumazid	NaN_3	0,15 g
Agar		8 g bis 18 g ^a
Wasser, destilliert oder deionisiert		1 000 ml
pH 7,1 ± 0,1 bei 25 °C		
^a In Abhängigkeit von den Gelieigenschaften des Agars.		

5.2.2.2 Nährmedium nach Slanetz und Bartley

Tabelle 4 — Zusammensetzung von Agar

Tryptose		20,0 g
Hefeextrakt		5,0 g
D-(+)-Glucose		2,0 g
Dikaliumhydrogenphosphat	K_2HPO_4	4,0 g
Natriumazid	NaN_3	0,4 g
2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid		0,1 g
Agar		8 g bis 18 g ^a
Wasser, destilliert oder deionisiert		1 000 ml
pH 7,2 ± 0,2 bei 25 °C		
^a In Abhängigkeit von den Gelieigenschaften des Agars.		

5.2.3 Vorbereitung

5.2.3.1 Galle-Äsculin-Azid-Agar

Das Nährmedium wird auf geeignete Behälter (Flaschen oder Kolben mit ungiftigen Metallschraubverschlüssen dürfen verwendet werden) aufgeteilt. Alle Bestandteile werden, wie in 5.2.2.1 beschrieben, durch Erhitzen in Wasser aufgelöst. Falls erforderlich, wird der pH-Wert so eingestellt, dass er nach dem Sterilisieren bei 25 °C 7,1 ± 0,1 beträgt. Für 15 min wird bei 121 °C ± 1 °C sterilisiert.

5.2.3.2 Nährmedium nach Slanetz und Bartley

Alle in 5.2.2.2 beschriebenen Bestandteile werden in Wasser durch Erhitzen in einem Dampftopf oder auf einem beheizbaren Magnetrührer gelöst. Falls erforderlich, wird der pH-Wert so eingestellt, dass er nach dem Sterilisieren bei 25 °C $7,2 \pm 1$ beträgt. Übermäßige Erwärmung muss vermieden werden. Entsprechend den Herstellerangaben darf dieses Nährmedium nicht autoklaviert werden. Es sollte nicht umgeschmolzen werden.

6 Geräte

Übliche Ausstattung eines mikrobiologischen Laboratoriums und insbesondere die folgenden:

6.1 Gerät für die Trockensterilisation (Heißluftsterilisator) und Dampfsterilisation (Autoklav)

Nach EN ISO 7218.

6.2 Brutschrank

Geeignet, eine Temperatur von 30 °C ± 1 °C aufrechtzuerhalten. Optional auch geeignet, eine Temperatur von 40 °C ± 1 °C und/oder 44 °C bis 47 °C aufrechtzuerhalten.

6.3 Wasserbad

Geeignet, Temperaturen von 44 °C bis 47 °C und 40 °C ± 1 °C aufrechtzuerhalten.

6.4 Labormixer

Folgende Geräte dürfen verwendet werden (EN ISO 7218):

- ein Rotations-Walkmischer (Mischer) mit einer variablen Nenndrehzahl von 3 000 min⁻¹ bis 10 000 min⁻¹ sowie aseptische Glas- oder Metallschüsseln, die mit Abdeckungen ausgestattet sind; oder
- ein Beutel-Walkmischer mit sterilen Beuteln (Rührer), möglicherweise mit der Option, die Mischgeschwindigkeit und -zeit anzupassen; oder
- ein Vibrationsmischgerät mit sterilen Beuteln; oder
- jedes andere Homogenisierungssystem mit gleichwertiger Effizienz (z. B. ein Handmixer mit aseptischem Becherglas).

6.5 Mechanisches Mischgerät

Ein mechanischer Mischer, z. B. Vortex-Mischer (siehe EN ISO 7218), oder gleichwertiges Gerät.

6.6 Waage

Waagen mit dem erforderlichen Bereich und der erforderlichen Genauigkeit nach EN ISO 7218 für die verschiedenen zu wiegenden Produkte.

6.7 Kolben oder Schraubflaschen mit entsprechenden Fassungsvermögen

6.8 Kulturröhrchen mit entsprechenden Fassungsvermögen

6.9 Pipetten oder Pipettierer und sterile Spitzen zur Abgabe von 0,1 ml bis 1 ml

6.10 Sterile 5-ml-Messpipetten

Für Vollausschlag mit breiten (ca. 3 mm) Spitzen (z. B. serologische Pipette; alternativ: 5-ml-Messpipetten ohne Spitzen).

6.11 Sterile Ausstrichspatel

Sterile L-förmige oder dreieckig geformte Ausstrichspatel aus Glas oder Metall oder sterile Ausstrichspatel aus Kunststoff zum Einmalgebrauch.

Alternativ ist die Verwendung eines Spiralplattengeräts mit einem desinfizierten Dosiersystem oder von Einweg-Mikrospritzen möglich.

6.12 Sterile Petrischalen mit Nocken, 90 mm im Durchmesser

6.13 Laminarbox

6.14 Mikroskop

Geeignet für die Phasenkontrastmikroskopie bei 600facher bis 1 000facher Vergrößerung.

6.15 pH-Messgerät

Mit einer Kalibrierungsgenauigkeit von $\pm 0,1$ pH-Einheiten bei 20 °C bis 25 °C.

6.16 Dampftopf oder beheizbarer Magnetrührer

Geeignet, eine Temperatur von 100 °C aufrechtzuerhalten.

7 Probenahme

Das Probenahmeverfahren ist nach der spezifischen Norm für das entsprechende Produkt durchzuführen. Liegt keine derartige spezifische Norm vor, wird den betreffenden Vertragspartnern empfohlen, diesbezüglich eine Vereinbarung zu treffen. Allgemeine Regeln [1] für die amtliche Kontrolle der Probenahme von Futtermitteln sind anzuwenden.

ANMERKUNG Die Probenahme kann nach EN ISO 6497 [3] erfolgen. Obwohl EN ISO 6497 nicht für Mikroorganismen vorgesehen ist, scheint das in dieser Norm beschriebene Verfahren am besten geeignet zu sein, um für Mikroorganismen als Futtermittelzusatzstoffe in Betracht gezogen zu werden, da keine anderen geeigneten Referenzen bestehen.

WARNUNG — Es ist darauf zu achten, eine mögliche Kreuzkontamination der Proben mit Mikroorganismen zu vermeiden, besonders nach der Probenahme von Zusatzstoffen und Vormischungen, die mit Mikroorganismen ergänzt werden. Falls notwendig, ist die Ausrüstung für die Probenahme vor jeder Probenahme zu reinigen und zu desinfizieren, besonders nach der Probenahme von Mikroorganismen enthaltenden Zusatzstoffen und Vormischungen. Die Probe ist in einem sterilen Behälter aufzubewahren.

8 Vorbereitung der Untersuchungsprobe

Die Vorbereitung der Untersuchungsprobe muss nach EN ISO 6498 und der entsprechenden Produktnorm erfolgen. EN ISO 6498 enthält allgemeine Richtlinien für die Vorbereitung der Untersuchungsprobe.

9 Durchführung

9.1 Herstellung der Agarplatten

Das Nährmedium wird wie in 5.2.3 beschrieben oder nach den Angaben des Herstellers hergestellt. Nach dem Autoklavieren (Galle-Äsculin-Azid-Agar) oder Kochen (Nährmedium nach Slanetz und Bartley) und dem Abkühlen in einem Wasserbad auf eine Temperatur von etwa 44 °C bis 47 °C werden Anteile von etwa 20 ml unter sterilen Bedingungen in jede Petrischale (6.12) gegossen und verteilt, um eine gleichmäßige Schicht zu erhalten.

WARNUNG — Natriumazid und TTC sind hitzeempfindliche Bestandteile. Eine nochmalige Verflüssigung durch Erhitzen ist nicht zulässig!

Wenn das Nährmedium erstarrt ist, werden vier umgedrehte Platten aufeinandergestapelt und bei Raumtemperatur oder in einem Brutschrank bei 37 °C ± 1 °C für etwa 12 h oder über Nacht getrocknet. Alternativ sind die Agarplatten in der Laminarbox auszubreiten, um die Agaroberfläche für 30 min mit partiell abgehobenen Deckeln zu trocknen.

Die getrockneten Platten sind auf Sterilität zu überprüfen.

Die getrockneten Platten sind auf Sterilität zu überprüfen. Bei entsprechendem Schutz vor Austrocknung dürfen getrocknete Platten bis zu zwei Wochen lang in einem Kühlschrank bei 5 °C ± 3 °C gelagert werden. Die Platten werden auf Raumtemperatur gebracht, bevor sie verwendet werden.

9.2 Herstellung des selektiven Nährmediums für das Gussplattenverfahren

Nach der Sterilisation wird das Nährmedium bei 44 °C bis 47 °C in einem Wasserbad oder Brutschrank bis zur Herstellung der Agarplatten aufbewahrt. Das hergestellte Nährmedium muss am selben Tag verwendet werden, und die Homogenität der Inhaltsstoffe muss sichergestellt sein.

WARNUNG — Natriumazid und TTC sind hitzeempfindliche Bestandteile. Eine nochmalige Verflüssigung durch Erhitzen ist nicht zulässig!

9.3 Herstellung der Erstverdünnung und der Dezimalverdünnungen

Tabelle 5 — Empfohlene Probenmengen und entsprechende Mengen an temperierter Verdünnungslösung für die Herstellung von Erstverdünnungen für verschiedene Futtermittel und die Behandlung der Erstverdünnungen

Art der Probe	Kritischer Kupfergehalt mg/kg	Gewicht der Probe g oder ml	Verdünnungs- lösung für die Verdünnung ml	Verdünnungs- faktor der Erst- verdünnung	Behandlung der Erst- verdünnung
Zusatzstoffe	nicht zutreffend	5,0 ± 5 %	495 ± 2 %	1 : 100	Mischer oder Rührer 5 min.
Vormischungen	> 2 000				
Mischfuttermittel	> 200	50,0 ± 5 %	450 ± 2 %	1 : 10	
Milchaustausch- Futtermittel	nicht zutreffend				
pastöses und öhlhaltiges Futtermittel	≥ 400	5,0 ± 5 %	90 ± 2 % + 5 g Tween® 80 [6]	1 : 20	Rührer 5 min.

Die empfohlene Probenmenge wird in eine aseptische Mischerschüssel, ein Becherglas oder einen Kunststoffbeutel eingewogen. Die entsprechende Menge an temperierter Verdünnungslösung (5.1) wird zugegeben. Werden eingekapselte Enterokokken analysiert, muss für die Herstellung der Erstverdünnung je nach Größe der Kapseln eine ausreichende Menge an Probenmaterial verwendet werden. Die Anzahl der Kapseln sollte mehr als 25 betragen, um eine Standardabweichung von weniger als 20 % für eine gute Reproduzierbarkeit der Analyse zu erhalten.

Es wird empfohlen, den Kupfergehalt in der Erstverdünnung in einer Voruntersuchung zu ermitteln. Kupfergehalte über 20 mg/l in der Erstverdünnung erfordern die Anwendung eines Chelatbildners, z. B. Iminodisessigsäure, in einer für den pH-Wert geeigneten Konzentration (siehe Anhang A).

Wird in einer ersten Analyse ein deutlich niedrigerer Wert als erwartet ermittelt, wird empfohlen, die Analyse mit einem breiteren Verhältnis von Probengewicht zu Verdünnungsvolumen für die Erstverdünnung (5.1) zu wiederholen oder die Probe mit keimarmer Getreidekleie zu mischen, um den Einfluss von Störstoffen zu reduzieren.

Für Mischfuttermittel wird dringend empfohlen, die Analyse in zweifacher Ausführung durchzuführen, um Abweichungen zu minimieren. Das Ergebnis ist der Durchschnitt beider Proben. Bei pelletierten Mischfuttermitteln wird eine weiche Trockenmahlung für 30 s empfohlen, um ein grobes Pulver zu erhalten. Übermäßige Erwärmung, die die Mikroorganismen schädigen kann, ist zu vermeiden.

Nach den spezifischen Verfahren für dehydrierte Produkte und Produkte mit niedrigem a_w -Wert in ISO 6887-4 [4] wird empfohlen, die Probe genau in ein vordosiertes Volumen an temperierter Verdünnungslösung (5.1) einzuwiegen, um den osmotischen Schock auf die Mikroflora zu minimieren.

Es wird empfohlen, den pH-Wert der Erstverdünnung zu überprüfen und im Bereich von 7,3 bis 8,1 einzustellen.

Die Proben werden 5 min lang mit einer Drehzahl von 3 000 min⁻¹ bis 5 000 min⁻¹ gemischt (siehe [6.4]) oder 5 min lang mit hoher Drehzahl in einem Rührer gerührt.

Für die Wiederbelebung, den Schaumaufschluss und die Rehydratation wird empfohlen, die anfängliche Verdünnung 15 min im Labor bei Umgebungstemperatur (18 °C bis 27 °C) zu lassen, bevor weitere Verdünnungen vorbereitet werden.

ANMERKUNG Heftiges Aufschäumen in der Erstverdünnung während des Mischens kann durch die Anwendung eines geeigneten Antischaummittels (z. B. Silikon-Antischaummittel) in angemessenen Konzentrationen vermieden werden.

Eine erste Verdünnung wird aus der behandelten Erstverdünnung hergestellt. Es wird eine 1-ml-Pipette (6.9) für Zusatzstoffe oder eine 5-ml-Pipette (6.10) für Mischfuttermittel und Vormischungen verwendet.

1 ml oder 5 ml der Erstverdünnung wird (werden) in ein Röhrchen überführt, das 45 ml sterile, auf Raumtemperatur gebrachte PBS oder PSS enthält, und mit einem mechanischen Mischer gemischt. Das Gewicht des Pipettenvolumens muss kalibriert werden, um einen Korrekturfaktor für die Berechnung der Keimzahl von *Enterococcus*-Arten zu erhalten.

WARNUNG — Suspensionen, die mikrobielle Zusatzstoffe enthalten, neigen zum schnellen Absetzen. Es ist sicherzustellen, dass die Erstverdünnung homogen ist, bevor Teilproben für weitere Verdünnungen pipettiert werden. Dies geschieht, indem der Mischer langsam laufen gelassen wird.

Weitere Dezimalverdünnungen (Verdünnungsreihe) sind mit einer sterilen 1-ml-Pipette, wie z. B. ein auf 1 ml eingestellter Mikrodispenser, herzustellen. 1 ml der Erstverdünnung wird in ein Kulturröhrchen mit 9 ml steriler PBS (5.1.1) oder PSS (5.1.2) gegeben und mit einem mechanischen Mischer gemischt. Dieses Verfahren ist zu wiederholen, bis die für die mutmaßliche Keimzahl geeignete Verdünnungsstufe erreicht ist.