

DIN EN 16936

ICS 65.120

Einsprüche bis 2016-02-04

Entwurf

**Futtermittel –
Probenahme- und Untersuchungsverfahren –
Screening auf die Antibiotika Tylosin, Virginiamycin, Spiramycin,
Bacitracin-Zink und Avoparcin in Konzentrationen unterhalb von
Zusatzstoffen in Mischfuttermitteln mittels mikrobiologischem Plattentest;
Deutsche und Englische Fassung prEN 16936:2015**

Animal feeding stuffs –
Methods of sampling and analysis –
Screening on the antibiotics tylosin, virginiamycin, spiramycin, bacitracin-zinc and avoparcin
at sub-additive levels in compound feed by a microbiological plate test;
German and English version prEN 16936:2015

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2015-12-04 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und
Stellungnahme vorgelegt.

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

Stellungnahmen werden erbeten

- vorzugsweise online im Norm-Entwurfs-Portal des DIN unter www.entwuerfe.din.de 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/stellungnahme 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 (Hausanschrift: Burggrafenstr. 6, 10787 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 36 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN 16936:2015) wurde von der Arbeitsgruppe 3 „Futterzusatzstoffe und Pharmazeutika“ (Sekretariat: NEN, Niederlande) des Technischen Komitees CEN/TC 327 „Futtermittel — Probenahme- und Untersuchungsverfahren“, dessen Sekretariat von NEN (Niederlande) gehalten wird, unter Beteiligung deutscher Experten erarbeitet.

Für die deutsche Mitarbeit ist der Arbeitsausschuss NA 057-03-03 AA „Futtermittel“, (Spiegelausschuss zu CEN/TC 327) im DIN-Normenausschusses Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) verantwortlich.

Um Zweifelsfälle in der Übersetzung auszuschließen, ist die englische Originalfassung der prEN 16930:2015 beigelegt. Die Nutzungsbedingungen für den deutschen Text des Norm-Entwurfes gelten gleichermaßen auch für den englischen Text.

CEN/TC 327

Datum: 2015-11

prEN 16936:2015

CEN/TC 327

Sekretariat: NEN

Futtermittel — Probenahme- und Untersuchungsverfahren — Screening auf die Antibiotika Tylosin, Virginiamycin, Spiramycin, Bacitracin-Zink und Avoparcin in Konzentrationen unterhalb von Zusatzstoffen in Mischfuttermitteln mittels mikrobiologischem Plattentest

Élément introductif — Élément central — Élément complémentaire

Animal feeding stuffs — Methods of sampling and analysis — Screening on the antibiotics tylosin, virginiamycin, spiramycin, bacitracin-zinc and avoparcin at sub-additive levels in compound feed by a microbiological plate test

ICS:

Deskriptoren

Dokument-Typ: Europäische Norm

Dokument-Untertyp:

Dokument-Stage: CEN-Umfrage

Dokument-Sprache: D

STD Version 2.7g

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	3
1 Anwendungsbereich	4
2 Normative Verweisungen	4
3 Kurzbeschreibung	4
4 Reagenzien und Materialien	4
4.1 Prüforganismen	4
4.2 Nährmedien	4
5 Geräte	8
6 Probenvorbereitung	9
6.1 Vorbereitung der Testplatten	9
6.2 Probenextraktion	9
7 Messungen	9
7.1 Durchführung	9
7.2 Interpretation	9
7.3 Identifizierung	10
8 Bestimmung von Konzentrationen	10
9 Präzision	11
10 Untersuchungsbericht	12
Anhang A (informativ) Vorbereitung von Bakteriensuspensionen	13
Anhang B (normativ) Verfahren für die zusätzliche Identifizierung von störenden Antibiotikarückständen	14
Literaturhinweise	17

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN 16936:2015) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 327 „Futtermittel — Probenahme- und Untersuchungsverfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat vom NEN gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur CEN-Umfrage vorgelegt.

Dieses Dokument wurde unter einem Mandat erarbeitet, das die Europäische Kommission und die Europäische Freihandelszone dem CEN erteilt haben.

WARNUNG — Bei der Anwendung dieses Dokuments ist es möglich, dass gefährliche Substanzen, Arbeitsgänge und Geräte angewendet werden. Dieses Dokument erhebt nicht den Anspruch, dass alle mit seiner Anwendung verbundenen Sicherheitsprobleme angesprochen werden. Es liegt in der Verantwortung des Anwenders dieses Dokuments, geeignete Vorkehrungen für den Arbeits- und Gesundheitsschutz zu treffen und vor der Anwendung die Anwendbarkeit einschränkender Vorschriften zu bestimmen.

1 Anwendungsbereich

Dieses Verfahren beschreibt das Screening auf die Antibiotika Tylosin, Virginiamycin, Spiramycin, Bacitracin-Zink und Avoparcin in Konzentrationen unterhalb von Zusatzstoffen in Alleinfuttermitteln und Milchaustausch-Futtermitteln mittels mikrobiologischem 3-Platten-Test (Allgemeiner Hemmstofftest). Die Nachweisgrenze des Verfahrens beträgt 1 mg/kg bei Avoparcin, Tylosin, Spiramycin und Virginiamycin sowie 5 mg/kg bei Bacitracin-Zink. Das Vorhandensein weiterer Antibiotika (aus Tierarzneimitteln) kann das Verfahren beeinträchtigen. Weiterhin können hohe Konzentrationen von Metallen (Cu, Zn) stören. Das Verfahren sollte als ein qualitatives Screeningverfahren angewendet werden. Positive Ergebnisse können mittels Dünnschichtchromatographie (en: thin layer chromatography, TLC) weiter analysiert werden, für Bestätigungszwecke ist die Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie (en: liquid chromatography/mass spectrometry, LC-MS) empfehlenswert [1].

Eine niedrigere Nachweisgrenze bei Bacitracin-Zink (3 mg/kg) ist erreichbar (siehe Tabelle 2), sie sollte jedoch erst durch eine laborinterne Validierung etabliert werden.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente, die in diesem Dokument teilweise oder als Ganzes zitiert werden, sind für die Anwendung dieses Dokuments erforderlich. 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 13969, *Milch und Milchprodukte — Anleitung für eine vereinheitlichte Beschreibung mikrobiologischer Hemmstofftests (ISO 13969)*

3 Kurzbeschreibung

Die Futtermittelprobe wird mit einem Gemisch von Aceton, Salzsäure (HCl) und Wasser extrahiert. Der neutralisierte Extrakt wird in Vertiefungen in drei verschiedenen Testplatten gegeben. Jede dieser Testplatten enthält eine andere Zusammensetzung in Bezug auf das Nährmedium, Indikatorbakterium und/oder den pH-Wert. Nach einer Bebrütungsdauer von 16 h bis 18 h wird das Vorhandensein von Antibiotikarückständen durch das Erscheinen eines Bereichs der Wachstumshemmung um die Probe herum angezeigt. Der Vergleich des (Erscheinungs-)Musters der Hemmung mit einem Referenzset (Tabelle 1) kann eine präsumtive Identifizierung des Antibiotikarückstandes ergeben.

4 Reagenzien und Materialien

4.1 Prüforganismen

Kocuria rhizophila ATCC 9341 (vormals: *Micrococcus luteus*)

Micrococcus luteus ATCC 10240

Bacillus megatherium ATCC 10778

Hinsichtlich der Vorbereitung von Bakteriensuspensionen siehe Anhang A.

4.2 Nährmedien

Zur Verbesserung der Vergleichspräzision (Reproduzierbarkeit) des Verfahrens wird für die Herstellung der Nährmedien die Verwendung von dehydrierten Grundbestandteilen oder dehydrierten Vollmedien empfohlen. Den Anweisungen der Hersteller ist zu folgen.

4.2.1 Nährmedium für *Kocuria rhizophila* ATCC 9341

Pepton aus Fleisch	6 g
Trypton	4 g
Hefeextrakt	3 g
Fleischextrakt	1,5 g
Glucose	1 g
Agar	15 g
Dikaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4)	20 g (wird nach dem Sterilisieren hinzugefügt)
Demineralisiertes Wasser	1 000 ml

Das dehydrierte Grundmedium ist kommerziell als Antibiotic medium No. 1 erhältlich.

Die Bestandteile werden durch Erwärmen in Wasser gelöst. Das Medium wird bei $(121 \pm 1)^\circ\text{C}$ für 15 min autoklaviert.

Der pH-Wert wird auf $8,0 \pm 0,1$ eingestellt.

4.2.2 Nährmedium für *Micrococcus luteus* ATCC 10240

Pepton aus Fleisch	6 g
Trypton	4 g
Hefeextrakt	3 g
Fleischextrakt	1,5 g
Glucose	1 g
Agar	15 g
Demineralisiertes Wasser	1 000 ml

Das dehydrierte Grundmedium ist kommerziell als Antibiotic medium No. 1 erhältlich.

Die Bestandteile werden durch Erwärmen in Wasser gelöst. Das Medium wird bei $(121 \pm 1)^\circ\text{C}$ für 15 min autoklaviert.

Der pH-Wert wird auf $6,5 \pm 0,1$ eingestellt.

4.2.3 Nährmedium für *Bacillus megatherium* ATCC 107

Casein, pankreatisch verdaut (Pankreasaufschluss von Casein)	5 g
Hefeextrakt	2,5 g
Glucose	1 g
Agar	15 g

Demineralisiertes Wasser 1 000 ml

Das dehydrierte Grundmedium ist kommerziell als Plate Count Agar erhältlich.

Die Bestandteile werden durch Erwärmen in Wasser gelöst. Das Medium wird bei $(121 \pm 1)^\circ\text{C}$ für 15 min autoklaviert.

Der pH-Wert wird auf $6,0 \pm 0,1$ eingestellt.

4.3 Wasser, demineralisiert oder deionisiert oder mindestens gleichwertig.

4.4 Natriumchlorid (NaCl).

4.5 Aceton, analysenrein.

4.6 Salzsäure (HCl).

4.7 Dikaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4).

4.8 Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4).

4.9 Natriumhydroxid (NaOH).

4.10 Methanol, analysenrein.

4.11 Extraktionslösemittel: Aceton/Salzsäure/Wasser-Gemisch (475/25/500, v/v)

500 ml Wasser (4.3) werden in einen 1 000-ml-Messkolben überführt, 25 ml Salzsäure (4.6) werden hinzugefügt und die Lösung wird durchmischt. Mit Aceton (4.5) wird auf 1 000 ml aufgefüllt.

4.12 Phosphatpuffer mit pH-Wert 6,5

18,6 g Kaliumdihydrogenphosphat (4.7) und 14,8 g Dikaliumhydrogenphosphat (4.7) werden in Wasser (4.3) gelöst. Der pH-Wert wird auf $6,5 \pm 0,1$ eingestellt und mit Wasser (4.3) wird auf 1 000 ml aufgefüllt.

4.13 Salzsäurelösung: 0,1 M

500 ml Wasser (4.3) werden in einen 1 000-ml-Messkolben überführt. Langsam werden 8,212 ml Salzsäure (4.6) hinzugegeben. Mit Wasser (4.3) wird bis zu einem Endvolumen von 1 000 ml aufgefüllt.

4.14 Standardlösemittel: Aceton/0,1 M Salzsäure (60:40, v/v)

400 ml der 0,1 M Salzsäure (4.13) werden in einen 1 000-ml-Messkolben überführt, 600 ml Aceton (4.5) werden hinzugefügt und die Lösung wird durchmischt.

4.15 Standardlösungen und Kontrollproben

Alle Einwaagen werden hinsichtlich der Reinheit und der Salzgehalte nach EN ISO 13969 korrigiert.

4.15.1 Neomycin-Standard-Stammlösung

$(50,0 \pm 0,1)$ mg Neomycin werden in 100 ml Wasser (4.3) gelöst und die Lösung wird durchmischt. Die so hergestellte Neomycin-Standard-Stammlösung enthält 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Neomycin. Die Neomycin-Standard-Stammlösung darf für einen Monat aufbewahrt werden, wenn sie bei 0°C bis $+5^\circ\text{C}$ gelagert wird.

4.15.2 Tylosinlösungen und -kontrollproben

4.15.2.1 Tylosin-Standard-Stammlösung

(5,0 ± 0,1) mg Tylosin werden in 5 ml Methanol (4.10) gelöst. Mit Phosphatpuffer mit pH-Wert 6,5 (4.12) wird auf 100 ml verdünnt und die Lösung durchmischt. Die so hergestellte Tylosin-Standard-Stammlösung enthält 50 µg/ml Tylosin. Die Tylosin-Standard-Stammlösung darf für einen Monat aufbewahrt werden, wenn sie bei 0 °C bis +5 °C gelagert wird.

4.15.2.2 Tylosin-Arbeitslösung

2 ml Tylosin-Standard-Stammlösung (4.15.2.1) werden mit Wasser (4.3) auf 100 ml verdünnt und die Lösung wird durchmischt. Die so hergestellte Tylosin-Arbeitslösung enthält 1 µg/ml Tylosin.

4.15.2.3 Tylosin-Kontrollprobe

10,0 mg der Futtermittelprobe werden eingewogen und mit 0,2 ml Tylosin-Standard-Stammlösung (4.15.2.1) aufgestockt. Die Lösung wird durchmischt und vor Beginn der Analyse bei Raumtemperatur für 30 min stehengelassen. Diese positive Kontrollprobe enthält 1 mg/kg Tylosin.

4.15.3 Avoparcin-Standard-Stammlösung und -Kontrollproben

4.15.3.1 Avoparcin-Standard-Stammlösung

(5,0 ± 0,1) mg Avoparcin werden in Aceton/0,1 M Salzsäure (4.14) gelöst und auf 100 ml aufgefüllt. Die so hergestellte Avoparcin-Standard-Stammlösung enthält 50 µg/ml Avoparcin. Die Avoparcin-Standard-Stammlösung darf für einen Monat aufbewahrt werden, wenn sie bei 0 °C bis +5 °C gelagert wird.

4.15.3.2 Avoparcin-Kontrollprobe

10,0 mg der Futtermittelprobe werden eingewogen und mit 0,2 ml Avoparcin-Standard-Stammlösung (4.15.3.1) aufgestockt. Die Lösung wird durchmischt und vor Beginn der Analyse bei Raumtemperatur für 30 min stehengelassen. Diese positive Kontrollprobe enthält 1 mg/kg Avoparcin.

4.15.4 Spiramycin-Standard-Stammlösung und -Kontrollproben

4.15.4.1 Spiramycin-Standard-Stammlösung

(5,0 ± 0,1) mg Spiramycin werden in 5 ml Methanol (4.10) gelöst. Mit Wasser (4.3) wird auf 100 ml verdünnt und die Lösung durchmischt. Die so hergestellte Spiramycin-Standard-Stammlösung enthält 50 µg/ml Spiramycin. Die Spiramycin-Standard-Stammlösung darf für einen Monat aufbewahrt werden, wenn sie bei 0 °C bis +5 °C gelagert wird.

4.15.4.2 Spiramycin-Kontrollprobe

10,0 mg der Futtermittelprobe werden eingewogen und mit 0,2 ml Spiramycin-Standard-Stammlösung (4.15.4.1) aufgestockt. Die Lösung wird durchmischt und vor Beginn der Analyse bei Raumtemperatur für 30 min stehengelassen. Diese positive Kontrollprobe enthält 1 mg/kg Spiramycin.

4.15.5 Virginiamycin-Standard-Stammlösung und -Kontrollproben

4.15.5.1 Virginiamycin-Standard-Stammlösung

(5,0 ± 0,1) mg Virginiamycin werden in 5 ml Methanol (4.10) gelöst. Mit Wasser (4.3) wird auf 100 ml verdünnt und die Lösung durchmischt. Die so hergestellte Virginiamycin-Standard-Stammlösung enthält

50 µg/ml Virginiamycin. Die Virginiamycin-Standard-Stammlösung darf für einen Monat aufbewahrt werden, wenn sie bei 0 °C bis +5 °C gelagert wird.

4.15.5.2 Virginiamycin-Kontrollprobe

10,0 mg der Futtermittelprobe werden eingewogen und mit 0,2 ml Virginiamycin-Standard-Stammlösung (4.15.5.1) aufgestockt. Die Lösung wird durchmischt und vor Beginn der Analyse bei Raumtemperatur für 30 min stehengelassen. Diese positive Kontrollprobe enthält 1 mg/kg Spiramycin.

4.15.6 Bacitracin-Zink-Standard-Stammlösung und -Kontrollproben

4.15.6.1 Bacitracin-Zink-Standard-Stammlösung

(5,0 ± 0,1) mg Bacitracin-Zink werden in 5 ml der 0,1 M Salzsäure (4.13) gelöst. 5 ml Phosphatpuffer mit pH-Wert 6,5 (4.12) werden hinzugefügt und die Lösung wird durchmischt und mit Wasser (4.3) auf 50 ml verdünnt. Die so hergestellte Bacitracin-Zink-Standard-Stammlösung enthält 100 µg/ml Bacitracin-Zink. Die Bacitracin-Zink-Standard-Stammlösung darf für einen Monat aufbewahrt werden, wenn sie bei 0 °C bis +5 °C gelagert wird.

4.15.6.2 Bacitracin-Zink-Kontrollprobe

10,0 mg der Futtermittelprobe werden eingewogen und mit 0,5 ml Bacitracin-Zink-Standard-Stammlösung (4.15.6.1) aufgestockt. Die Lösung wird durchmischt und vor Beginn der Analyse bei Raumtemperatur für 30 min stehengelassen. Diese positive Kontrollprobe enthält 5 mg/kg Bacitracin-Zink.

5 Geräte

Übliche Laborausstattung und insbesondere Folgendes:

5.1 **Übliche Laborglasgeräte.**

5.2 **Analysenwaage**, mit der auf 0,1 mg gewogen werden kann.

5.3 **Autoklav.**

5.4 **Laborschüttler** oder Magnetrührer.

5.5 **Messschieber** oder gleichwertiges Gerät.

5.6 **Zentrifuge** (~ 3 000 × g).

5.7 **Brutschränke**, bei (25 ± 1) °C und (30 ± 1) °C.

5.8 **pH-Messgerät.**

5.9 **Mikropipetten**, Fassungsvermögen 5 µl bis 1 000 µl.

5.10 **Korkbohrer** (12 mm Durchmesser).

5.11 **Bioassay-Schalen oder -platten (für den einmaligen Gebrauch) aus Kunststoff.**

Beispielsweise: 120 mm × 120 mm × 20 mm oder 245 mm × 245 mm × 20 mm.

6 Probenvorbereitung

6.1 Vorbereitung der Testplatten

Nach dem Sterilisieren wird das Nährmedium in einem Wasserbad auf 50 °C abgekühlt.

Das Nährmedium für *K. rhizophila* ATCC 9341 (4.2.1) wird mit Neomycinlösung (4.15.1) auf eine Endkonzentration von 1 mg/l supplementiert und mit der Bakteriensuspension auf endgültige 106 KBE/ml beimpft.

Das Nährmedium für *M. luteus* ATCC 10240 (4.2.2) wird mit Tylosinlösung (4.15.2.2) auf eine Endkonzentration von 7,5 µg/l supplementiert und mit der Bakteriensuspension auf endgültige 106 KBE/ml beimpft.

Das Nährmedium für *B. megatherium* ATCC 10778 (4.2.3.) wird mit der Bakteriensuspension auf endgültige 105 KBE/ml beimpft.

Eine Menge von jedem der drei beimpften Medien wird in einzelne Bioassay-Platten (5.11) überführt, sodass sich eine Schicht von etwa 2,5 mm Dicke ergibt. Dem Medium wird ermöglicht, eine ebene Oberfläche auszurichten. Mit einem Korkbohrer (5.10) mit einem Durchmesser von 12 mm wird aus der Agarschicht Material für Probenlöcher entnommen. Der Abstand zwischen der Mitte der Löcher sollte mindestens 30 mm und der Abstand von der Kante 15 mm betragen. Es wird empfohlen, den Korkbohrer zu desinfizieren, bevor er für ein anderes Bakterium eingesetzt wird.

Es wird empfohlen, mit der Untersuchung am Tag der Vorbereitung der Platten fortzufahren, da die Aufbewahrung möglicherweise die Größe der Hemmzone (Hemmhof) beeinflussen könnte. Jede Verlängerung der Haltbarkeit sollte vorher validiert werden.

6.2 Probenextraktion

10,0 g der Probe werden in einen ausreichend großen Behälter eingewogen. 20 ml Extraktionslösemittel (4.11) werden hinzugefügt und die Lösung wird für 15 min geschüttelt. 10 ml Phosphatpuffer mit pH-Wert 6,5 (4.12) werden hinzugefügt und die Lösung wird für weitere 15 min geschüttelt.

Die Probe wird zentrifugiert (10 min, 3 000 × g), der Überstand wird in einen frischen Behälter überführt und der pH-Wert auf 6,0 bis 6,5 eingestellt.

Es wird empfohlen, mit der Untersuchung der Probe am Tag der Vorbereitung fortzufahren, da die Aufbewahrung möglicherweise die Stabilität der Antibiotikarückstände beeinflussen könnte. Wird eine spätere Untersuchung beabsichtigt, sollte die Stabilität zuerst validiert werden.

7 Messungen

7.1 Durchführung

Ein aliquoter Anteil von 0,2 ml des Futtermittlextraktes (6.2) wird auf jede der drei Testplatten (6.1) aufgebracht. Das schließt eine geeignete positive Kontrollprobe (4.15.2.3, 4.15.3.2, 4.15.4.2, 4.15.5.2, 4.15.6.2, siehe Tabelle 1) von jeder der drei Testplatten ein.

Die Platten werden für 16 h bis 18 h bei (30 ± 1) °C (*K. rhizophila* und *M. luteus*) oder (25 ± 1) °C (*B. megatherium*) bebrütet.

7.2 Interpretation

Das Vorhandensein von Antibiotika wird durch die Bildung einer Zone der Wachstumshemmung um die Vertiefung herum sichtbar, die den Extrakt enthält.