

DIN EN 16939

ICS 65.120

Einsprüche bis 2016-01-27

Entwurf

**Futtermittel –
Probenahme- und Untersuchungsverfahren –
Nachweis von Tylosin, Spiramycin und Virginiamycin –
Dünnschichtchromatographie und Bioautographie;
Deutsche und Englische Fassung prEN 16939:2015**

Animal feeding stuffs –
Methods of sampling and analysis –
Detection of tylosin, spiramycin and virginiamycin – Thin-layer chromatography and
bioautography;
German and English version prEN 16939:2015

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2015-11-27 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 51 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN 16939:2015) 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 16939 beigelegt. Die Nutzungsbedingungen für den deutschen Text des Norm-Entwurfes gelten gleichermaßen auch für den englischen Text.

Für die in diesem Dokument zitierten Internationalen Normen wird im Folgenden auf die entsprechenden Deutschen Normen hingewiesen:

ISO 4833	siehe DIN EN ISO 4833
ISO 7218	siehe DIN EN ISO 7218
ISO 11133	siehe DIN EN ISO 11133

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN EN ISO 4833, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Horizontales Verfahren für die Zählung von Mikroorganismen — Koloniezählverfahren bei 30 °C*

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

DIN EN ISO 11133, *Mikrobiologie von Lebensmitteln, Futtermitteln und Wasser — Vorbereitung, Herstellung, Lagerung und Leistungsprüfung von Nährmedien*

Futtermittel - Probenahme- und Untersuchungsverfahren — Nachweis von Tylosin, Spiramycin und Virginiamycin — Dünnschichtchromatographie und Bioautographie

Animal feeding stuffs - Methods of sampling and analysis — Detection of Tylosin, Spiramycin and Virginiamycin — Thin Layer Chromatography and bioautography

ICS:

Deskriptoren

Dokument-Typ: Europäische Norm

Dokument-Untertyp:

Dokument-Stage: CEN-Umfrage

Dokument-Sprache: D

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	3
1 Anwendungsbereich	4
2 Normative Verweisungen	4
3 Begriffe	4
4 Kurzbeschreibung	6
5 Reagenzien und Nährmedien	6
6 Geräte	9
7 Probenahme	10
8 Vorbereitung der Untersuchungsproben	10
9 Durchführung	10
9.1 Extraktion	10
9.2 Blindwertprobe des Futtermittels, aufgestockt mit 1 mg/kg Spiramycin und 0,5 mg/kg Tylosin (mikrobiologische Aktivität)	10
9.3 Blindwertprobe des Futtermittels, aufgestockt mit 1 mg/kg Virginiamycin (mikrobiologische Aktivität)	10
9.4 Reinigung und Konzentration	10
9.5 Dünnschichtchromatographie	11
9.6 Bioautographie	11
10 Ergebnisse	12
10.1 Beobachtung von Hemmzonen	12
10.2 Störungen	13
11 Präzision	14
11.1 Ringversuch	14
11.2 Wiederholpräzision	14
11.3 Vergleichpräzision	14
12 Untersuchungsbericht	14
Anhang A (informativ) Hemmzonen ergebende Substanzen	15
Anhang B (informativ) Ergebnisse des Ringversuchs	17
B.1 Allgemeines	17
B.2 Materialien	17
B.3 Statistik	18
B.4 Ergebnis und Interpretation	19
Anhang C (informativ) Vorbereitung der Bakteriensuspensionen	23
C.1 Allgemeines	23
C.2 Klassische/alte Vorbereitung	23
C.3 Alternative Vorbereitung der Bakteriensuspension	24
C.4 Bakterienzahl	24
C.5 Lagerung	24
Literaturhinweise	25

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN 16939:2015) 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

Das Verfahren ermöglicht es, Spiramycin, Tylosin und Virginiamycin in Futtermitteln (Futtermittel-Ausgangserzeugnisse hauptsächlich pflanzlichen Ursprungs und Mischfuttermittel) nachzuweisen und zu identifizieren, davon ausgeschlossen sind Mineralfuttermittel und Vormischungen. Die Nachweisgrenze (en: limit of detection, LOD) beträgt 2 mg/kg bei Spiramycin, 1 mg/kg bei Tylosin und 1 mg/kg bei Virginiamycin. In einigen Milchaustausch-Futtermitteln kann die Nachweisgrenze bei Virginiamycin leicht über 1 mg/kg liegen.

Die berichteten Nachweisgrenzen werden wahrscheinlich ein wenig überschätzt, sie wurden aber während des Ringversuchs vollständig validiert (siehe Anhang B). In jedem Laboratorium, an jedem Tag der Untersuchung werden aufgestockte Blindwertproben mit 1 mg/kg bei Spiramycin und Virginiamycin sowie mit 0,5 mg/kg bei Tylosin zur Prüfung der unteren Nachweisgrenzen (siehe 9.2 und 9.3) untersucht. Diese unteren Nachweisgrenzen sind erreichbar, sie sollten jedoch zuerst mit einer internen Validierung bestimmt werden.

Einige andere Antibiotika können den Nachweis dieser drei spezifischen Makrolid-Antibiotika stören. Die bekannten Störungen (Interferenzen) sind in Anhang A des Verfahrens angegeben.

Das Verfahren sollte als ein qualitatives Screeningverfahren und/oder Post-Screeningverfahren (beispielsweise nach dem mikrobiologischen Plattentest) angewendet werden. Die Nachuntersuchung hinsichtlich des Vorhandenseins der Antibiotika kann durch andere Untersuchungstechniken (LC- und/oder LC-MS-Verfahren) [4] [9] erfolgen. Für Bestätigungszwecke ist die Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie (en: liquid chromatography/mass spectrometry, LC-MS) erforderlich.

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 6498:2012, *Futtermittel — Leitfaden für die Probenvorbereitung (ISO 6498:2012)*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

3.1 mikrobiologische Aktivität von Antibiotika
angegeben als Internationale Einheit/mg oder µg/mg mit der Möglichkeit, über mikrobiologische Aktivitäten höher oder geringer als 1 000 µg/mg zu verfügen

3.2 Retentionsfaktor
R_f

(en: retardation factor)
Verhältnis des Abstandes des gewanderten Produktes (Substanzfleck) zum Abstand der gewanderten Lösemittelfront (Laufmittelfront) mittels der anfänglichen Startlinie (Ort, an dem die Probe punktförmig aufgetragen wird) als Referenz

Anmerkung 1 zum Begriff: Diese Werte sind vom verwendeten Lösemittel (Laufmittel) und dem Typ der TLC-Platte abhängig und sind physikalisch nicht konstant.

Anmerkung 2 zum Begriff: Siehe Bild 1.

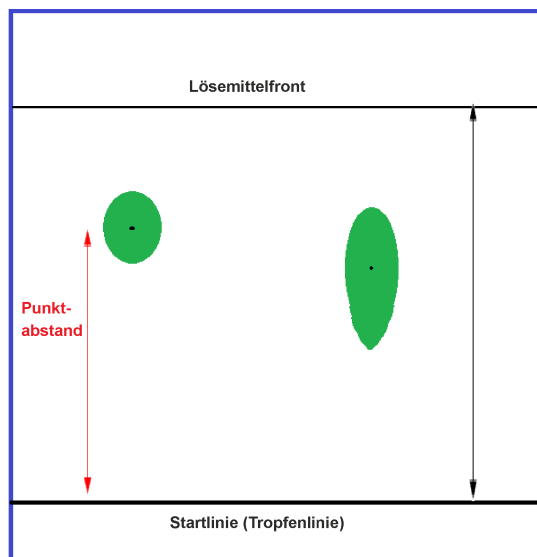


Bild 1 — TLC-Platte mit 2 Hemmzonen (grün)

3.3

Empfindlichkeit des Verfahrens

SE

(en: sensitivity of a method)

Fähigkeit des Verfahrens eine positive Probe als positiv zu einzuordnen

3.4

Spezifität des Verfahrens

SP

(en: specificity of a method)

Fähigkeit (des Verfahrens) eine negative Probe als negativ zu einzuordnen

3.5

Spiramycin

Makrolid-Antibiotikum und häufig ein Gemisch von verschiedenen Kofaktoren (Spiramycin I, II, III ...)

Anmerkung 1 zum Begriff: Ein mg Spiramycin-Basis wird als gleich 3 200 Internationale Einheiten angesehen.

3.6

Tylosin

Makrolid-Antibiotikum und Gemisch von vier Makrolid-Antibiotika, die von einem Stamm von *Streptomyces fradiae* erzeugt werden, und das von der Herstellungsquelle abhängt

Anmerkung 1 zum Begriff: Der Hauptbestandteil des Gemisches (> 80 %) ist Tylosin A. Tylosin B (Desmycosin), Tylosin C (Macrocin) und Tylosin D (Relomycin) können ebenfalls vorhanden sein. Alle vier Bestandteile tragen zur Aktivität von Tylosin bei, die nicht geringer als 900 IU/mg ist, berechnet bezogen auf die getrocknete Substanz (Europäisches Arzneibuch). Die relativen antimikrobiellen Aktivitäten von Tylosinderivaten sind: Tylosin A – 1,0, Tylosin B – 0,83, Tylosin C – 0,75 und Tylosin D – 0,35.

3.7

Virginiamycin

Makrolid-Antibiotikum und Gemisch von zwei hauptsächlichen synergetischen Kofaktoren: Virginiamycinbestandteile M1 und S1

4 Kurzbeschreibung

Die Probe wird mit einem Gemisch von Methanol und Wasser extrahiert. Die Extrakte werden durch eine Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Chloroform gereinigt. Die Chloroform-Phase wird konzentriert. Die konzentrierten Futtermittelextrakte und die aufgestockten Extrakte der Referenzblindwertproben der Futtermittel werden der Dünnschichtchromatographie (en: thin layer chromatography, TLC) an Kieselgel unterzogen. Die Antibiotika werden durch Vergleich ihrer Rf-Werte mit denen der Standardsubstanzen mittels Bioautographie unter Anwendung von mit *Micrococcus luteus* beimpftem Agar-Nährmedium nachgewiesen und identifiziert.

5 Reagenzien und Nährmedien

Alle Reagenzien müssen von analytischer Reinheit sein.

5.1 Mikroorganismus: *Micrococcus luteus* ATCC 9341 (Neueinordnung als *Kocuria rhizophila* ATCC 9341)

Hinsichtlich der Vorbereitung von Bakteriensuspensionen siehe Anhang C.

Andere Techniken zur Vorbereitung und Lagerung der Bakteriensuspension dürfen eingesetzt werden, wenn die festgelegten Nachweisgrenzen erreicht werden können.

5.2 Nährmedien

Zum Verflüssigen der Medien vor dem Beimpfen mit *Micrococcus luteus* wird ein Wasserbad (6.6) genutzt.

Die antibiotischen Medien 1 und 11 dürfen für mindesten 6 Monate bei (5 ± 3) °C konserviert werden.

5.2.1 Antibiotisches Medium 1

Rindfleischextrakt:	1,5 g
Hefeextrakt:	3,0 g
Casein, pankreatisch verdaut (Pankreasauflschluss von Casein)	4,0 g
Pepton aus Fleisch:	6,0 g
Glucose:	1,0 g
Agar:	10 g bis 20 g
Wasser:	1 000 ml

Autoklavieren bei 121 °C für 15 min.

Endgültiger pH-Wert: $6,5 \pm 0,2$

5.2.2 Antibiotisches Medium 1 supplementiert mit Tylosin

Kurz vor dem Beimpfen mit *Micrococcus luteus* werden 0,2 % (v/v) der Tylosinlösung mit 4 µg/ml (5.20.10) zum Medium hinzugefügt.

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

5.2.3 Antibiotisches Medium 11

Die Zusammensetzung entspricht der vom antibiotischen Medium 1 (5.2.1), jedoch beträgt der endgültige pH-Wert: $8,0 \pm 0,2$

5.2.4 Antibiotisches Medium 11 supplementiert mit Methanol, Pufferlösung mit pH-Wert 8 und Tylosin

Kurz vor dem Beimpfen des Mediums mit *Micrococcus luteus* wird dem antibiotischen Medium 11 (5.2.3) Folgendes hinzugefügt:

- 4 % (v/v) Methanol (5.3);
- 10 % (v/v) der Pufferlösung mit pH-Wert 8 (5.14);
- 0,2 % (v/v) der Tylosinlösung mit 4 µg/ml (5.20.10).

Der pH-Wert wird auf $7,6 \pm 0,1$ eingestellt.

ANMERKUNG Die Zugabe von Methanol ermöglicht eine bessere Diffusion von Spiramycin in den Agar. Die Zugabe von Tylosin ermöglicht eine bessere Identifizierung und einen verschärften Nachweis bei der Bioautographie (9.6).

5.3 Methanol

5.4 Gemisch von Methanol (5.3) und Wasser 1/1 (v/v)

5.5 Chloroform

5.6 Ethylacetat (Essigsäureethylester)

5.7 Dichlormethan

5.8 Aceton

5.9 Glycerol

5.10 2, 3, 5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC)

5.11 Silikon-Schaumverhüter

Silikon-Schaumverhüter Typ SE2[®] oder gleichwertig.

5.12 Gemisch von Methanol und Phosphatpufferlösung mit pH-Wert 8,0 für die Spiramycin-Stammlösung

Phosphatpufferlösung:

Dikaliumhydrogenphosphat K_2HPO_4 :	6,7 g
Kaliumdihydrogenphosphat KH_2PO_4 :	0,5 g
Natriumhydrogencarbonat $NaHCO_3$:	20,0 g
Wasser bis:	1 000 ml
pH-Wert:	8,0

Ein Volumen Methanol wird mit einem Volumen der Phosphatpufferlösung durchmischt.

5.13 Phosphatpufferlösung mit pH-Wert 7,0 für die Tylosin-Stammlösung

Kaliumdihydrogenphosphat KH_2PO_4 :	5,5 g
Dikaliumhydrogenphosphat K_2HPO_4 :	13,6 g
Wasser bis:	1 000 ml
pH-Wert:	7,0

5.14 Phosphatpufferlösung mit pH-Wert 8,0 für die Supplementierung des antibiotischen Mediums Nr. 11

Dikaliumhydrogenphosphat K_2HPO_4 :	1,41 g
Dinatriumhydrogenphosphat $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$:	57,5 g
Wasser bis:	1 000 ml
Sterilisieren für 15 min bei 121 °C.	
pH-Wert:	8,0

5.15 Elutionsmittel 1 für den Nachweis von Spiramycin und Tylosin

5.16 Elutionsmittel 2 für den Nachweis von Spiramycin und Tylosin

Dichlormethan (5.7)/Methanol (5.3)/Aceton (5.8)/Glycerol (5.9): 49/30/20/1 (v/v/v/v).

Die Lösung wird frisch hergestellt.

5.17 Elutionsmittel 3 für den Nachweis von Virginiamycin

Ethylacetat mit Wasser gesättigt. In einem Scheidetrichter wird Ethylacetat (5.6) mit einem Wasserüberschuss geschüttelt. Die untere Phase wird verworfen. Die Lösung wird frisch hergestellt.

5.18 Kontrastlösung

0,1 g TTC = 2, 3, 5-Triphenyltetrazoliumchlorid (5.10) werden in 100 ml Wasser gelöst.

5.19 Blindwertprobe der Futtermittel (handelsübliche Futtermittel oder intern hergestellte Futtermittel), frei vom Antibiotikum

5.20 Referenz-Standardsubstanzen und Standard-Stammlösungen

5.20.1 Spiramycin-Standardsubstanz

Spiramycin von bekannter mikrobiologischer Aktivität (in $\mu\text{g}/\text{mg}$ oder entsprechend).

Zur Umwandlung von UI/mg zu $\mu\text{g}/\text{mg}$: 1 mg Spiramycin wird als gleichwertig mit 3 200 Internationalen Einheiten angesehen.

5.20.2 Tylosin-Standardsubstanz

Tylosin von bekannter mikrobiologischer Aktivität (in $\mu\text{g}/\text{mg}$ oder entsprechend).

5.20.3 Virginiamycin-Standardsubstanz

Virginiamycin von bekannter mikrobiologischer Aktivität (in µg/mg oder entsprechend).

5.20.4 Spiramycin-Stammlösung (1 000 µg/ml)

Eine genau eingewogene Quantität der Standardsubstanz (5.20.1) wird in dem Gemisch (5.12) gelöst und mit dem gleichen Gemisch verdünnt, um eine Lösung von 1 000 µg/ml mikrobiologischer Aktivität zu erhalten (entsprechend 3 200 IU/ml).

5.20.5 Tylosin-Stammlösung (500 µg/ml)

Die Standardsubstanz (5.20.2) wird für 3 Stunden bei 60 °C in einem Vakuumofen getrocknet.

Eine genau eingewogene Quantität der getrockneten Substanz wird in 5 ml Methanol (5.3) gelöst und mit Phosphatpufferlösung mit pH-Wert 7 (5.13) verdünnt, um eine Tylosin-Konzentration von 500 µg/ml mikrobiologischer Aktivität zu erhalten.

5.20.6 Virginiamycin-Stammlösung (1 000 µg/ml)

Eine genau eingewogene Quantität der Standardsubstanz (5.20.3) wird in Methanol gelöst und mit Methanol (5.3) verdünnt, um eine Virginiamycin-Konzentration von 1 000 µg/ml mikrobiologischer Aktivität zu erhalten.

5.20.7 Spiramycin-Lösung zum Aufstocken der Blindwertprobe des Futtermittels (entsprechend 100 µg/ml mikrobiologischer Aktivität)

Die Stammlösung (5.20.4) wird 1:10 mit Methanol (5.3) verdünnt.

5.20.8 Lebensmittel-Tylosin-Lösung zum Aufstocken der Blindwertprobe des Futtermittels (entsprechend 50 µg/ml mikrobiologischer Aktivität)

Die Stammlösung (5.20.5) wird 1:10 mit Methanol (5.3) verdünnt.

5.20.9 Virginiamycin-Lösung zum Aufstocken der Blindwertprobe des Futtermittels (entsprechend 100 µg/ml mikrobiologischer Aktivität)

Die Stammlösung (5.20.6) wird 1:10 mit Methanol (5.3) verdünnt.

5.20.10 Tylosin-Lösung (4 µg/ml) zum Anreichern der Medien Nr. 1 und Nr.11

Die Stammlösung (5.20.5) wird 1:125 mit Methanol (5.3) verdünnt.

6 Geräte

Übliche Laborausstattung und insbesondere Folgendes:

6.1 Brutschrank, eingestellt auf (35 ± 2) °C.

6.2 Brutschrank, eingestellt zwischen 55 °C und 60 °C zum Trocknen der HPTLC-Platten.

6.3 Magnetrührer.

6.4 Vortex-Mischer.

6.5 Zentrifuge.

6.6 Wasserbad, eingestellt zwischen 44 °C und 47 °C.

6.7 Verdampfer mit Stickstoffdurchfluss.

6.8 TLC-Kammern für Platten von 10 cm × 10 cm.

6.9 TLC-Platten

HPTLC-Glasplatten, beschichtet mit Kieselgel 60 Å, 10 cm × 10 cm, Dicke 200 µm oder gleichwertig.

6.10 quadratische Petrischalen, 12,5 cm × 12,5 cm.

7 Probenahme

Es ist wichtig, dass das Laboratorium eine wirklich repräsentative Probe erhält, die während des Transports oder der Lagerung nicht beschädigt oder verändert wurde.

Die Probenahme ist nicht Bestandteil des in dieser Europäischen Norm festgelegten Verfahrens. Ein zu empfehlendes Probenahmeverfahren ist in EN ISO 6497 [2] oder in der Verordnung Nr. 152/2009, Anhang I, [1] angegeben.

8 Vorbereitung der Untersuchungsproben

EN ISO 6498 oder die Verordnung Nr. 152/2009, Anhang II, Punkt A, [1] sind für die Vorbereitung der Untersuchungsproben geeignet.

Rohmaterialien für Futtermittel und Futtermittelproben werden vor der Untersuchung gemahlen und gesiebt (mindestens 1 mm).

9 Durchführung

9.1 Extraktion

10,0 g der Probe werden eingewogen. 50 ml des Methanol/Wasser-Gemisches (5.4) werden hinzugefügt. Für mindestens 30 min wird mit dem Magnetrührer (6.3) gerührt. Die Lösung wird zum Dekantieren stehengelassen oder, falls erforderlich, bei 2 000 g für 15 min (6.5) zentrifugiert.

9.2 Blindwertprobe des Futtermittels, aufgestockt mit 1 mg/kg Spiramycin und 0,5 mg/kg Tylosin (mikrobiologische Aktivität)

10,0 g der Futtermittelprobe (5.19) werden eingewogen. Jeweils 0,1 ml von den Spiramycin- und Tylosin-Aufstocklösungen (5.20.7 und 5.20.8) werden hinzugefügt; für eine Dauer von etwa 10 min wird gewartet und anschließend nach 9.1 extrahiert.

9.3 Blindwertprobe des Futtermittels, aufgestockt mit 1 mg/kg Virginiamycin (mikrobiologische Aktivität)

10,0 g der Futtermittelprobe (5.19) werden eingewogen. 0,1 ml Aufstocklösung (5.20.9) werden hinzugefügt; für eine Dauer von etwa 10 min wird gewartet und anschließend nach 9.1 extrahiert.

9.4 Reinigung und Konzentration

Ein Volumen von jedem der Extrakte 9.1, 9.2 und 9.3 (zum Beispiel 4 ml) wird jeweils in ein gesondertes Reagenzglas pipettiert. Das gleiche Volumen an Chloroform (5.5) wird hinzugefügt. Für einige Sekunden wird mit dem Vortex-Mischer (6.4) durchmischt. 2 ml der Chloroform-Phase (untere Phase) werden in ein

schmales Reagenzglas pipettiert. Unter einem Stickstoffdurchfluss (6.7) wird bei einer Temperatur unter 50 °C (6.6) bis zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wird in 0,2 ml Chloroform (5.5) gelöst.

9.5 Dünnschichtchromatographie

9.5.1 Punktförmiges Auftragen (Spotting) von Futtermittelextrakten und von aufgestockten Futtermittelextrakten

Im Abstand von 1 cm von der unteren Kante der Platten werden die Extrakte in Abständen von 1,5 cm voneinander aufgebracht:

- Beim Nachweis von Spiramycin und Tylosin: auf einer TLC-Platte (6.8) werden 20 µl der konzentrierten Futtermittelextrakte und 20 µl des konzentrierten, mit Spiramycin und Tylosin aufgestockten, Blindwertprobenextraktes des Futtermittels punktförmig aufgetragen.
- Beim Nachweis von Virginiamycin: auf einer anderen TLC-Platte (6.8) werden 20 µl der konzentrierten Futtermittelextrakte und 20 µl des konzentrierten, mit Virginiamycin aufgestockten, Blindwertprobenextraktes des Futtermittels punktförmig aufgetragen.

9.5.2 Chromatographie

9.5.2.1 Chromatographie bei Spiramycin und Tylosin

Die Platte wird auf 9 cm mit Ethylacetat (5.6) vorentwickelt.

Die Platte wird im Brutschrank, der zwischen 55 °C und 60 °C eingestellt ist (6.2), für etwa 30 min getrocknet.

Das Elutionsmittel 1 (5.15) wird in eine chromatographische Kammer (6.8) gegossen, um eine Höhe von etwa 5 mm zu erhalten und während einer Dauer von mindestens 30 min wird die Sättigung ermöglicht. Die Platte wird auf 8 cm entwickelt.

Wird eine Störung (Interferenz) nach der Bioautographie vermutet, wird Elutionsmittel 2 (5.16) unter den gleichen Bedingungen verwendet.

9.5.2.2 Chromatographie bei Virginiamycin

Das Elutionsmittel 3 (5.17) wird in eine chromatographische Kammer (6.8) gegossen, um eine Höhe von etwa 5 mm zu erhalten und während einer Dauer von mindestens 30 min wird die Sättigung ermöglicht. Die Platte wird auf 8 cm entwickelt.

9.6 Bioautographie

9.6.1 Allgemeines

Jede Platte wird in eine Petrischale (6.10) gestellt. Die Platten werden durch Einstellen der Petrischalen in den Brutschrank, der zwischen 55 °C und 60 °C eingestellt ist (6.2), für etwa 30 min getrocknet.

9.6.2 Bei Spiramycin und Tylosin

Das supplementierte antibiotische Medium 11 (5.2.4) wird mit der Bakteriensuspension (5.1.2) mit einer Konzentration von 1 % (v/v) beimpft.

Die Petrischale wird aus dem Brutschrank genommen und in die Schale werden sofort 25 ml des Mediums gegossen.

ANMERKUNG 1 Falls sich beim Gießen des Mediums auf die Platten Blasen bilden, kann das wie folgt vermieden werden:

- Agar wird nicht direkt auf das Kieselgel gegossen, sondern in eine Ecke der Petrischale und die Ausbreitung über die Platte zulassen;
- steriles Wasser wird auf das Kieselgel gesprüht bis das Gel nass ist (etwa 1 ml); oder
- etwa 0,1 % (w/v) Silikon-Schaumverhüter (5.11) werden direkt vor dem Beimpfen in das Medium gegeben.

Die Dicke des Mediums über der Platte beträgt 1,5 mm.

ANMERKUNG 2 Die Empfindlichkeit des Nachweises von Antibiotika wird durch die Dicke der Agarschicht beeinflusst: eine geringe Dicke verbessert diese, kann jedoch zu geringerem Wachstum der Prüfmikroorganismen führen.

Die Platte wird bei 35 °C (6.1) für eine Nacht bebrütet.

5 ml der TTC-Lösung (5.18) werden über das Medium gegossen und dieses erneut für einige Minuten bebrütet.

9.6.3 Bei Virginiamycin

Das mit Tylosin supplementierte antibiotische Medium 1 (5.2.2) wird mit der Bakteriensuspension (5.1.2) mit einer Konzentration von 1 % (v/v) beimpft.

Die Petrischale wird aus dem Brutschrank genommen und in die Schale werden sofort 25 ml des Mediums gegossen.

ANMERKUNG 1 Falls sich beim Gießen des Mediums auf die Platten Blasen bilden, kann das wie folgt vermieden werden:

- Agar wird nicht direkt auf das Kieselgel gegossen, sondern in eine Ecke der Petrischale und die Ausbreitung über die Platte zulassen;
- steriles Wasser wird auf das Kieselgel gesprüht bis das Gel nass ist (etwa 1 ml); oder
- etwa 0,1 % (w/v) Silikon-Schaumverhüter (5.11) werden direkt vor dem Beimpfen in das Medium gegeben.

Die Dicke des Mediums über der Platte beträgt 1,5 mm.

ANMERKUNG 2 Die Empfindlichkeit des Nachweises von Antibiotika wird durch die Dicke der Agarschicht beeinflusst: eine geringe Dicke verbessert diese, kann jedoch zu geringerem Wachstum der Prüfmikroorganismen führen.

Die Platte wird bei 35 °C (6.1) für eine Nacht bebrütet.

5 ml der TTC-Lösung (5.18) werden über das Medium gegossen und dieses erneut für einige Minuten bebrütet.

10 Ergebnisse

10.1 Beobachtung von Hemmzonen

Die Hemmzonen bei den aufgestockten Blindwertprobenextrakten des Futtermittels (aus 9.2, 9.3 und 9.4) und die etwaigen Hemmzonen bei unbekannten Futtermittlextrakten werden beobachtet.

Falls die Hemmzonen bei unbekannten Futtermittlextrakten zu groß sind, muss das Volumen für das punktförmige Auftragen (Spotting-Volumen) verringert werden.

Werden Hemmzonen bei unbekannten Futtermittelextrakten beobachtet, wird deren Retentionsfaktor (R_f) mit denen von Spiramycin, Tylosin und Virginiamycin in aufgestockten Blindwertprobenextrakten des Futtermittels verglichen.

Bei einem unförmigen/verzerrten Punkt ist es erforderlich, einen „Mittelpunkt“ abzuschätzen.

Der Nachweis wird als positiv angesehen, wenn der R_f dem des Standards (aufgestockte Blindwertproben des Futtermittels 9.2 und 9.3) entspricht ($\pm 10 \%$).

Referenzwerte von R_f sind in Tabelle 1 angegeben. Entsprechend den unkontrollierten Faktoren, wie z. B. Temperatur und relative Feuchte, variieren diese Werte leicht von Tag zu Tag. Unterscheidet sich jedoch der R_f von Kontrollen zu sehr ($\pm 20 \%$) von dem erwarteten R_f in Tabelle 1, muss die Untersuchung neu begonnen werden.

Die Elutionsmittel 1 und 2 werden für den Nachweis und die Identifizierung von Spiramycin und Tylosin verwendet.

Das Elutionsmittel 3 wird für den Nachweis von Virginiamycin verwendet.

Im Fall des Tylosin-Nachweises muss das Nichtvorhandensein von Virginiamycin mit Elutionsmittel 3 überprüft werden; falls Virginiamycin und wenn auch eine Hemmzone bei R_f 0 mit Elutionsmittel 3 vorhanden ist, kann das Vorhandensein von Tylosin nicht ausgeschlossen werden.

Die Ergebnisse werden als „Positiv“ oder „Negativ“ (oder in entsprechender Formulierung) angegeben.

Im Zweifelsfall (mögliche Störungen, Gemisch von mehreren Antibiotika usw.) werden weitere Europäische Normen (Bestätigungs-/Identifizierungsverfahren, z. B. Anwendung der LC-MS-Verfahren) angewendet, um die Verdachtsmomente zu bestätigen oder zu entkräften.

Tabelle 1 — R_f von Spiramycin, Tylosin und Virginiamycin

	Spiramycin	Tylosin	Virginiamycin
Elutionsmittel 1 (5.15)	0,40	0,80	0,81
Elutionsmittel 2 (5.16)	0,32	0,79	0,81
Elutionsmittel 3 (5.17)	0	0	0,32

10.2 Störungen

Die folgenden Substanzen stören nicht und ergeben keine Hemmzonen bei den in Klammern angegebenen Konzentrationen (mg/kg):

Flavophospholipol (20); Maduramicin (5); Oxolinsäure (500); Neomycin (100); Kanamycin (100); Apramycin (100); Colistin (2000 UI/g); Furazolidon (300); Trimethoprim (5); Sulfadiazin (500); Spectinomycin (50); Amprolium (125); Ethopabat (133); Dimetridazol (200); Meticlorpindol (200); Decoquinat (40); Robenidin (66); Methylbenzoquat (110); Halofuginon (3); Nicarbazin (125); Nifursol (75); Diclazuril (1); Ronidazol (90); Semduramicin (25); Flubendazol (30); Oxybendazol (30); Ivermectin (2); Carbadox (15), Olaquinox (15), Avoparcin (5), Bacitracin (5).

Substanzen, die Hemmzonen ergeben und diejenigen, die stören, sind in Tabelle A.1 festgelegt.

Bei Fütterungsarzneimitteln können große Zonen der Hemmung infolge der zugegebenen Antibiotika kleinere Hemmzonen infolge von Spiramycin, Tylosin und Virginiamycin überdecken und stören, auch wenn der Rf unterschiedlich ist.

ANMERKUNG Störsubstanzen, wie in Anhang A, Tabelle A.1, beschrieben, bilden Hemmzonen mit den Elutionsmitteln 1, 2 oder 3. Das bedeutet, dass es möglich ist, diese Substanzen durch Anwendung dieser Europäischen Norm nachzuweisen. Jedoch wurde das Nachweisvermögen dieser anderen Substanzen während des Ringversuchs nicht geprüft. Es liegt in der Verantwortung jedes Laboratoriums, das Nachweisvermögen von anderen Substanzen als Spiramycin, Tylosin und Virginiamycin bei unterschiedlichen Konzentrationsniveaus zu validieren.

11 Präzision

11.1 Ringversuch

Die Einzelheiten des von JRC-IRMM (Geel-B) und SCL L35 (Rennes-F) im Jahr 2005 [3] im Auftrag des Europäischen SIMBAG-Feed-Projektes [4] organisierten Ringversuchs in Bezug auf das Verfahren sind in Anhang B zusammengefasst.

11.2 Wiederholpräzision

Nicht anwendbar. Diese Europäische Norm beschreibt ein qualitatives Verfahren mit nur einem semi-quantitativen Ansatz durch die Abschätzung der Breite/Größe von Hemmzonen. Der semi-quantitative Ansatz wurde während des Ringversuchs nicht validiert. Es liegt in der Verantwortung jedes Laboratoriums, falls erforderlich, dieses und die damit verbundene Wiederholpräzision zu bewerten.

11.3 Vergleichpräzision

Nicht anwendbar. Diese Europäische Norm beschreibt ein qualitatives Verfahren mit nur einem semi-quantitativen Ansatz durch die Abschätzung der Breite/Größe von Hemmzonen. Der semi-quantitative Ansatz wurde während des Ringversuchs nicht validiert. Es liegt in der Verantwortung jedes Laboratoriums, falls erforderlich, dieses und die damit verbundene Vergleichpräzision zu bewerten.

12 Untersuchungsbericht

Der Untersuchungsbericht muss die folgenden Angaben enthalten:

- a) alle Angaben, die zur vollständigen Identifizierung der Probe erforderlich sind;
- b) das Probenahmeverfahren, falls bekannt;
- c) das verwendete Untersuchungsverfahren unter Verweisung auf diese Europäische Norm, d. h. prEN 16939:2015;
- d) das (die) erhaltene(n) Untersuchungsergebnis(se), angegeben auf eine qualitative Art (negativ/positiv oder entsprechend);
- e) alle Einzelheiten des Verfahrensablaufs, die nicht in dieser Europäischen Norm festgelegt sind oder als wahlfrei erachtet wurden, sowie Einzelheiten zu allen Umständen, die das (die) Untersuchungsergebnis(se) beeinflusst haben könnten.