

---

## INDICE

	<b>PREMESSA</b>	1
	<b>INTRODUZIONE</b>	2
1	<b>SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE</b>	2
2	<b>RIFERIMENTI NORMATIVI</b>	2
3	<b>TERMI E DEFINIZIONI</b>	2
4	<b>PRINCIPIO</b>	3
5	<b>DILUENTI E TERRENI DI COLTURA</b>	3
5.1	Diluenti.....	3
	prospetto 1 Soluzione salina tamponata con fosfato con Polisorbato 80 (Tween® 80)(tPBS) .....	4
	prospetto 2 Soluzione di sale peptone (PSS) secondo la EN ISO 6887-1 .....	4
5.2	Terreni di coltura .....	4
	prospetto 3 Composizione dell'agar bile esculina azide .....	5
	prospetto 4 Composizione dell'agar Slanetz e Bartley.....	5
6	<b>APPARECCHIATURA</b>	6
7	<b>CAMPIONAMENTO</b>	7
8	<b>PREPARAZIONE DEL CAMPIONE DI PROVA</b>	7
9	<b>PROCEDIMENTO</b>	7
9.1	Preparazione di piastre di agar incorporato per il metodo dello spatalamento superficiale .....	7
9.2	Preparazione dei terreni di coltura per il metodo della semina per inclusione .....	8
9.3	Preparazione della sospensione iniziale e diluizioni decimali .....	8
	prospetto 5 Quantità di campione raccomandate e volumi corrispondenti di diluente temperato per la preparazione delle sospensioni iniziali di vari mangimi e per il trattamento della sospensione iniziale .....	8
9.4	Inoculazione e incubazione delle piastre .....	9
9.5	Enumerazione delle colonie .....	10
9.6	Conferma.....	10
10	<b>ESPRESSIONE DEI RISULTATI</b>	10
11	<b>PRECISIONE</b>	11
11.1	Generalità.....	11
11.2	Studi interlaboratorio .....	11
11.3	Ripetibilità.....	11
11.4	Riproducibilità .....	11
12	<b>RAPPORTO DI PROVA</b>	12
<b>APPENDICE</b> (informativa)	<b>A NOTA SULLA PROCEDURA</b>	13
A.1	Generalità .....	13
A.2	Concentrazione critica di rame .....	13
<b>APPENDICE</b> (informativa)	<b>B RISULTATI DELLO STUDIO INTERLABORATORIO</b>	14
B.1	Studio interlaboratorio basato su agar bile esculina azide .....	14

---

B.2	prospetto B.1	Dati sulla precisione ricavati dallo studio interlaboratorio .....	14
		Studio interlaboratorio basato sull'agar Slanetz e Bartley .....	14
	prospetto B.2	Dati sulla precisione ricavati dagli studi collaborativi della VDLUFA .....	15
		<b>BIBLIOGRAFIA</b>	16

---

QUESTO DOCUMENTO È UNA PREVIEW. RIPRODUZIONE VIETATA

## PREMESSA

Il presente documento (EN 15788:2021) è stato elaborato dal Comitato Tecnico CEN/TC 327 "Animal feeding stuffs - Methods of sampling and analysis", la cui segreteria è affidata al NEN.

Alla presente norma europea deve essere attribuito lo status di norma nazionale, o mediante pubblicazione di un testo identico o mediante notifica di adozione, al più tardi entro maggio 2022, e le norme nazionali in contrasto devono essere ritirate al più tardi entro maggio 2022.

Si richiama l'attenzione sulla possibilità che alcuni degli elementi del presente documento possano essere oggetto di diritti di brevetto. Il CEN non deve essere ritenuto responsabile dell'identificazione di tali brevetti.

Il presente documento sostituisce la EN 15788:2009.

Le principali modifiche rispetto all'edizione precedente sono le seguenti:

- modifica del titolo;
- ampliamento dello scopo e campo di applicazione a tutti gli *Enterococchi* utilizzati come additivo per mangimi;
- aggiornamento dei riferimenti normativi crociati;
- integrazione di soluzione salina tamponata con fosfato con Tween® 80;
- aggiunta della possibilità di utilizzare la soluzione salina integrata, tamponata con fosfato con Tween® 80, per preparare la sospensione iniziale e il diluente per le diluizioni seriali;
- aggiunta di agar Slanetz e Bartley come terreno di rilevamento selettivo;
- sostituzione del miscelatore da laboratorio richiesto, con velocità di rotazione da 18 000 min<sup>-1</sup> a 22 000 min<sup>-1</sup>, con dispositivi di omogeneizzazione per esempio secondo la EN ISO 7218, con velocità di rotazione massima richiesta di 10 000 min<sup>-1</sup>;
- unificazione a cinque minuti del tempo di omogeneizzazione per la preparazione delle sospensioni iniziali di tutte le matrici di mangime;
- aggiunta dell'opzione di utilizzare un piatto a spirale per la piastratura;
- preparazione delle sospensioni iniziali, generalmente eseguita con un tampone fosfato salino temperato (tPBS);
- aggiunta del metodo della semina per inclusione come tecnica di coltivazione alternativa;
- aggiunta all'informativa dell'Appendice A di una procedura di indagine sui mangimi contenenti quantità elevate di rame;
- aggiunta, come enumerazione di dati, di validazioni ottenuti utilizzando agar Slanetz e Bartley in prove ad anello VDLUFA su varie matrici di mangimi;
- adeguamento degli intervalli di numeri di colonie ammessi per il conteggio, da "≥ 30 a ≤ 350" a da "≥ 10 a ≤ 200" colonie per piastra.

Eventuali commenti e quesiti sul presente documento dovrebbero essere indirizzati all'organismo di normazione nazionale degli utilizzatori. Un elenco completo di tali organismi è disponibile nel sito web del CEN.

Secondo le Regole Comuni CEN-CENELEC, gli enti nazionali di normazione dei seguenti Paesi sono tenuti a recepire la presente norma europea: Austria, Belgio, Bulgaria, Cipro, Croazia, Danimarca, Estonia, Finlandia, Francia, Germania, Grecia, Irlanda, Islanda, Italia, Lettonia, Lituania, Lussemburgo, Malta, Norvegia, Paesi Bassi, Polonia, Portogallo, Regno Unito, Repubblica Ceca, Repubblica della Macedonia del Nord, Romania, Serbia, Slovacchia, Slovenia, Spagna, Svezia, Svizzera, Turchia e Ungheria.

## INTRODUZIONE

Questa metodologia è stata sviluppata per enumerare gli enterococchi (*E. faecium*) come additivi per mangimi, per permettere alla Commissione europea di verificare la corretta etichettatura dei prodotti per l'alimentazione animale. Essa è stata redatta per la prima volta durante il progetto UE SMT4-CT98-2235 "Metodi per il controllo ufficiale dei probiotici utilizzati come additivi per mangimi" [1]. È stata modificata introducendo un secondo terreno dal metodo VDLUFA 28.2.3 "Enumerazione di *Enterococcus faecium*" [2]. Il metodo si basa su una vagliatura approfondita di 12 terreni preselezionati e reperibili in commercio per il rilevamento e l'enumerazione degli enterococchi. La metodologia specificata è stata validata da studi interlaboratorio sullo *E. faecium* ([1], [2], [3]). Si può presumere che lo stesso metodo sia adatto anche per altri *Enterococcus* spp.

Questo metodo non è selettivo per gli enterococchi (*E. faecium*) utilizzati come additivi per mangimi, ma può essere applicato per enumerare gli *Enterococcus* spp. negli additivi, nelle premiscele e nei mangimi composti, presumendo che gli enterococchi aggiunti (*E. faecium*) siano presenti in numero molto più elevato rispetto a qualsiasi altro enterococco.

Questo metodo non è applicabile per rilevare i contaminanti ubiquitari o fecali di *Enterococcus* spp. negli alimenti e nei mangimi per animali.

1

## SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE

Il presente documento specifica le regole generali per l'enumerazione degli enterococchi (*E. faecium*) nei mangimi (additivi, premiscele e mangimi composti, esclusi i mangimi minerali) contenenti enterococchi come singolo componente di microrganismi o in abbinamento con altri microrganismi. L'utilizzo del metodo in premiscele e mangimi composti contenenti quantità critiche di rame richiede una procedura particolare (vedere punto A.2). Il presente documento non si applica ai mangimi minerali, definiti come mangimi complementari composti principalmente da minerali e contenenti almeno il 40% di ceneri grezze [Regolamento (CE) 767/2009] [4].

Vi sono varie categorie di campioni di mangime:

- Additivi contenenti circa  $10^{10}$  unità costitutive di colonie (CFU)/g;
- Premiscele contenenti  $10^{11}$  CFU/kg;
- Mangimi composti, farine o pellet contenenti circa  $10^9$  CFU/kg.

2

## RIFERIMENTI NORMATIVI

Nel testo si fa riferimento ai seguenti documenti in modo tale che il loro contenuto, in tutto o in parte, costituisca i requisiti per il presente documento. Per quanto riguarda i riferimenti datati, si applica esclusivamente l'edizione citata. Ai riferimenti non datati si applica l'ultima edizione del documento a cui si fa riferimento (compresi gli aggiornamenti).

EN ISO 6498                  Animal feeding stuffs - Guidelines for sample preparation (ISO 6498)

3

## TERMI E DEFINIZIONI

Ai fini del presente documento si applicano i termini e le definizioni seguenti.

Per l'utilizzo in ambito normativo l'ISO e l'IEC dispongono di banche dati terminologiche ai seguenti indirizzi:

- ISO Online browsing platform: disponibile all'indirizzo <https://www.iso.org/obp>
- IEC Electropedia: disponibile all'indirizzo <https://www.electropedia.org/>