

DIN EN ISO 15213-2:2024-05 (D)

Mikrobiologie der Lebensmittelkette - Horizontales Verfahren zum Nachweis und zur Zählung von *Clostridium* spp. - Teil 2: Zählung von *Clostridium perfringens* durch Koloniezählverfahren (ISO 15213-2:2023); Deutsche Fassung EN ISO 15213-2:2023

| Inhalt | Seite |
|---|-------|
| Europäisches Vorwort..... | 10 |
| Vorwort..... | 11 |
| Einleitung..... | 13 |
| 1 Anwendungsbereich..... | 14 |
| 2 Normative Verweisungen..... | 15 |
| 3 Begriffe..... | 15 |
| 4 Kurzbeschreibung..... | 16 |
| 4.1 Allgemeines..... | 16 |
| 4.2 Herstellung von Verdünnungen..... | 16 |
| 4.3 Zählung..... | 16 |
| 4.4 Bestätigung..... | 17 |
| 5 Nährmedien und Reagenzien..... | 17 |
| 6 Geräte und Verbrauchsmaterialien..... | 17 |
| 7 Probenahme..... | 18 |
| 8 Herstellung der Untersuchungsprobe..... | 18 |
| 9 Durchführung..... | 18 |
| 9.1 Allgemeines..... | 18 |
| 9.2 Prüfmenge, Erstverdünnung und Verdünnungen..... | 18 |
| 9.3 Hitzebehandlung zur Selektion von Sporen..... | 18 |
| 9.4 Beimpfung und Bebrütung..... | 19 |
| 9.5 Zählung typischer Kolonien..... | 20 |
| 9.6 Bestätigung von <i>C. perfringens</i> | 20 |
| 9.6.1 Selektion von Kolonien für die Bestätigung..... | 20 |
| 9.6.2 Prüfung auf saure Phosphatase..... | 21 |
| 9.6.3 Prüfung mittels Sulfit-Indol-Motilität-Agar (SIM-Agar)..... | 21 |
| 9.6.4 Differenzierung zwischen humanpathogenen und nichtpathogenen <i>C. perfringens</i> - Stämmen (optional)..... | 21 |
| 9.6.5 Interpretation..... | 21 |
| 10 Angabe der Ergebnisse..... | 21 |
| 11 Validierung des Verfahrens..... | 22 |
| 11.1 Ringversuch..... | 22 |
| 11.2 Leistungsmerkmale..... | 22 |
| 12 Untersuchungsbericht..... | 23 |
| 13 Qualitätssicherung..... | 24 |
| Anhang A (normativ) Fließschema des Verfahrens..... | 25 |
| Anhang B (normativ) Nährmedien und Reagenzien..... | 27 |
| B.1 Allgemeines..... | 27 |
| B.2 Tryptose-Sulfit-Cycloserin-Agar (TSC-Agar) [18]..... | 27 |

| | | |
|--|--|----|
| B.2.1 | Basismedium | 27 |
| B.2.2 | D-Cycloserinlösung..... | 28 |
| B.2.3 | Vollständiges Medium | 28 |
| B.3 | Columbia-Blutagar (CBA) | 28 |
| B.3.1 | Columbia-Blutagar-Grundmedium..... | 28 |
| B.3.2 | Defibriertes Blut (Pferde- oder Schafsblut)..... | 29 |
| B.3.3 | Vollständiges Grundmedium..... | 29 |
| B.4 | Reagenz für saure Phosphatase..... | 29 |
| B.4.1 | Zusammensetzung | 29 |
| B.4.2 | Herstellung..... | 30 |
| B.5 | Sulfit-Indol-Motilität-Agar (SIM-Agar) | 30 |
| B.5.1 | Zusammensetzung | 30 |
| B.5.2 | Herstellung..... | 30 |
| B.6 | Kovacs-Reagenz | 30 |
| B.6.1 | Zusammensetzung | 30 |
| B.6.2 | Herstellung..... | 30 |
| B.7 | Leistungsprüfung | 31 |
| Anhang C (informativ) Verfahrensvalidierungsstudien und Leistungsmerkmale | | 33 |
| Anhang D (informativ) Molekulare Differenzierung zwischen pathogenen und nichtpathogenen | | |
| | <i>C. perfringens</i> | 37 |
| D.1 | Allgemeines..... | 37 |
| D.2 | Gel-basierter Multiplex-PCR-Assay zur Differenzierung von <i>C. perfringens</i> | 37 |
| D.2.1 | Leistungsmerkmale (siehe ISO 22118) | 37 |
| D.2.2 | Geräte und Reagenzien..... | 39 |
| D.3 | Real-time-Multiplex-PCR-Assay zur Differenzierung von <i>C. perfringens</i> | 46 |
| D.3.1 | Leistungsmerkmale (siehe ISO 22118) | 46 |
| D.3.2 | Geräte und Reagenzien..... | 47 |
| D.4 | Multiplex-PCR-Assay zur Differenzierung von chromosomal codierten <i>cpe</i> -Genen und plasmidcodierten <i>cpe</i> -Genen..... | 52 |
| D.4.1 | Leistungsmerkmale (siehe ISO 22118) | 52 |
| D.4.2 | Geräte und Reagenzien..... | 54 |
| Literaturhinweise..... | | 61 |
| | | |
| Bilder | | |
| Bild A.1 — Fließschema des Koloniezählverfahrens für <i>C. perfringens</i> | | 26 |
| | | |
| Tabellen | | |
| Tabelle 1 — Zusammenfassung der s_r -Werte aus dem Ringversuch | | 22 |
| Tabelle 2 — Zusammenfassung der s_R -Werte aus dem Ringversuch..... | | 23 |
| Tabelle B.1 — Leistungsprüfung zur Qualitätssicherung der Nährmedien und Reagenzien..... | | 31 |
| Tabelle C.1 — Ergebnisse der Datenanalyse von Fertigsuppe (Kategorie: Mehrkomponenten- Lebensmittel bzw. Mahlzeitkomponenten) | | 33 |
| Tabelle C.2 — Ergebnisse der Datenanalyse von Ananas in Dosen (Kategorie: verarbeitetes Obst und Gemüse) | | 34 |

| | |
|---|-----------|
| Tabelle C.3 — Ergebnisse der Datenanalyse von Umweltabstrichen (Kategorie: Umgebungsproben [Lebensmittel- oder Futtermittelproduktion]) | 34 |
| Tabelle C.4 — Ergebnisse der Datenanalyse von Futtersilage (Kategorie: (Heim-)Tierfuttermittel)..... | 34 |
| Tabelle C.5 — Ergebnisse der Datenanalyse von Fisch in Dosen (Kategorie: verzehrfertige, aufwärmfertige Fischereiprodukte)..... | 35 |
| Tabelle C.6 — Ergebnisse der Datenanalyse von Corned Beef in Dosen (Kategorie: verzehrfertige, aufwärmfertige Fleischprodukte)..... | 35 |
| Tabelle C.7 — Ergebnisse der Datenanalyse von Säuglingsnahrung in Pulverform (Kategorie: Säuglingsnahrung und Getreideprodukte für Kleinkinder)..... | 36 |
| Tabelle D.1 — Toxino- und entsprechende Genotypen von <i>C. perfringens</i> [22]..... | 37 |
| Tabelle D.2 — Inklusivität der Multiplex-PCR mit Zielstämmen..... | 38 |
| Tabelle D.3 — Exklusivität der Multiplex-PCR mit Nicht-Zielstämmen | 38 |
| Tabelle D.4 — Sequenzen von Oligonukleotiden..... | 40 |
| Tabelle D.5 — MasterMix..... | 43 |
| Tabelle D.6 — Temperatur-Zeit-Programm..... | 44 |
| Tabelle D.7 — Größe der Amplifikationsprodukte..... | 45 |
| Tabelle D.8 — Inklusivität der Multiplex-PCR mit Zielstämmen..... | 46 |
| Tabelle D.9 — Exklusivität der Multiplex-PCR mit Nicht-Zielstämmen | 46 |
| Tabelle D.10 — Sequenzen von Oligonukleotiden | 48 |
| Tabelle D.11 — MasterMix (Triplex-Real-time-PCR-System, <i>cpa</i>-Gen, <i>cpe</i>-Gen und IAC) | 50 |
| Tabelle D.12 — MasterMix (Duplex-Real-time-PCR-System, <i>cpb1</i>- und <i>cpb2</i>-Gen oder <i>etx</i>-Gen und <i>iap</i>-Gen)..... | 50 |
| Tabelle D.13 — Temperatur-Zeit-Programm | 51 |
| Tabelle D.14 — Inklusivität der Multiplex-PCR mit Zielstämmen | 52 |
| Tabelle D.15 — Exklusivität der Multiplex-PCR mit Nicht-Zielstämmen..... | 53 |
| Tabelle D.16 — Sequenzen von Oligonukleotiden | 54 |
| Tabelle D.17 — MasterMix | 57 |
| Tabelle D.18 — Temperatur-Zeit-Programm | 58 |
| Tabelle D.19 — Größe der Amplifikationsprodukte | 60 |