

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