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 *C. perfringens* ... 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 *C. perfringens*-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 Defibriniertes 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 *C. perfringens* ... **37**
D.1 Allgemeines ... **37**
D.2 Gel-basierter Multiplex-PCR-Assay zur Differenzierung von *C. perfringens* ... **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 *C. perfringens* ... **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 *cpe*-Genen und plasmidcodierten *cpe*-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 *C. perfringens* ... **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 *C. perfringens* [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, *cpa*-Gen, *cpe*-Gen und IAC) ... 50

Tabelle D.12 — MasterMix (Duplex-Real-time-PCR-System, *cpb1*- und *cpb2*-Gen oder *etx*-Gen und *iap*-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