

## DIN CEN ISO/TS 15213-3



ICS 07.100.30

**Mikrobiologie der Lebensmittelkette –  
Horizontales Verfahren zum Nachweis und zur Zählung von Clostridium  
spp. –  
Teil 3: Nachweis von Clostridium perfringens (ISO/TS 15213-3:2024);  
Deutsche Fassung CEN ISO/TS 15213-3:2024**

Microbiology of the food chain –  
Horizontal method for the detection and enumeration of Clostridium spp. –  
Part 3: Detection of Clostridium perfringens (ISO/TS 15213-3:2024);  
German version CEN ISO/TS 15213-3:2024

Microbiologie de la chaîne alimentaire –  
Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de Clostridium spp. –  
Partie 3: Recherche de Clostridium perfringens (ISO/TS 15213-3:2024);  
Version allemande CEN ISO/TS 15213-3:2024

Gesamtumfang 54 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Das Dokument CEN ISO/TS 15213-3:2024 wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 463 „Mikrobiologie der Lebensmittelkette“ erarbeitet, dessen Sekretariat von AFNOR (Frankreich) gehalten wird.

Das zuständige deutsche Normungsgremium ist der Arbeitskreis NA 057-01-06-02 AK „Sporenbildende Bakterien“ im DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL).

Technische Spezifikationen sind nicht Bestandteil des Deutschen Normenwerks.

Eine Technische Spezifikation ist das Ergebnis einer Normungsarbeit, das wegen bestimmter Vorbehalte zum Inhalt oder wegen des gegenüber einer Norm abweichenden Aufstellungsverfahrens von DIN noch nicht als Norm herausgegeben wird.

Zur vorliegenden Technischen Spezifikation wurde kein Entwurf veröffentlicht.

Erfahrungen mit dieser Technischen Spezifikation sind erbeten:

- vorzugsweise als Datei per E-Mail an [nalebensmittelundlandwirtschaftlicheprodukte@din.de](mailto:nalebensmittelundlandwirtschaftlicheprodukte@din.de) in Form einer Tabelle. Die Vorlage dieser Tabelle kann im Internet unter [www.din.de/stellungnahme](http://www.din.de/stellungnahme) abgerufen werden;
- oder in Papierform an den DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL), 10772 Berlin.

Für die in diesem Dokument zitierten Dokumente wird im Folgenden auf die entsprechenden deutschen Dokumente hingewiesen:

|                        |       |                                       |
|------------------------|-------|---------------------------------------|
| ISO 707                | siehe | DIN EN ISO 707                        |
| ISO 6887 (alle Teile)  | siehe | DIN EN ISO 6887 (alle Teile)          |
| ISO 7218               | siehe | DIN EN ISO 7218                       |
| ISO 11133              | siehe | DIN EN ISO 11133                      |
| ISO 13307              | siehe | DIN EN ISO 13307                      |
| ISO 14189              | siehe | DIN EN ISO 14189                      |
| ISO 15213-1            | siehe | DIN EN ISO 15213-1                    |
| ISO 15213-2:2023       | siehe | DIN EN ISO 15213-2:2024-05            |
| ISO 16140 (alle Teile) | siehe | DIN EN ISO 16140 (alle Teile)         |
| ISO 17468              | siehe | DIN EN ISO 17468                      |
| ISO 17604              | siehe | DIN EN ISO 17604                      |
| ISO/TS 17728           | siehe | DIN CEN ISO/TS 17728 (DIN SPEC 10053) |
| ISO 18593              | siehe | DIN EN ISO 18593                      |

Aktuelle Informationen zu diesem Dokument können über die Internetseiten von DIN ([www.din.de](http://www.din.de)) durch eine Suche nach der Dokumentennummer aufgerufen werden.

## Nationaler Anhang NA (informativ)

### Literaturhinweise

DIN CEN ISO/TS 17728 (DIN SPEC 10053), *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Probenahmetechniken für die mikrobiologische Untersuchung von Lebensmittel- und Futtermittelproben*

DIN EN ISO 707, *Milch und Milcherzeugnisse — Leitfaden zur Probenahme*

DIN EN ISO 6887 (alle Teile), *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Vorbereitung von Untersuchungsproben und Herstellung von Erstverdünnungen und von Dezimalverdünnungen für mikrobiologische Untersuchungen*

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*

DIN EN ISO 13307, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Primärproduktion — Probenahmetechniken*

DIN EN ISO 14189, *Wasserbeschaffenheit — Zählung von Clostridium perfringens — Verfahren mittels Membranfiltration*

DIN EN ISO 15213-1, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Horizontales Verfahren zum Nachweis und zur Zählung von Clostridium spp. — Teil 1: Zählung von sulfitreduzierenden Clostridium spp. durch Koloniezählverfahren*

DIN EN ISO 15213-2:2024-05, *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*

DIN EN ISO 16140 (alle Teile), *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Verfahrensvalidierung*

DIN EN ISO 17468, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Technische Anforderungen und Leitfaden zur Einführung oder Überarbeitung von genormten Referenzverfahren*

DIN EN ISO 17604, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Probenahme von Schlachttierkörpern zur mikrobiologischen Untersuchung*

DIN EN ISO 18593, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Horizontales Verfahren für Probenahmetechniken von Oberflächen*

– Leerseite –

Deutsche Fassung

Mikrobiologie der Lebensmittelkette —  
Horizontales Verfahren zum Nachweis und zur Zählung von  
Clostridium spp. —  
Teil 3: Nachweis von Clostridium perfringens  
(ISO/TS 15213-3:2024)

Microbiology of the food chain —  
Horizontal method for the detection and enumeration  
of Clostridium spp. —  
Part 3: Detection of Clostridium perfringens  
(ISO/TS 15213-3:2024)

Microbiologie de la chaîne alimentaire —  
Méthode horizontale pour la recherche et le  
dénombrement de Clostridium spp. —  
Partie 3: Recherche de Clostridium perfringens  
(ISO/TS 15213-3:2024)

Diese Technische Spezifikation (CEN/TS) wurde vom CEN am 6. Februar 2024 als eine künftige Norm zur vorläufigen Anwendung angenommen.

Die Gültigkeitsdauer dieser CEN/TS ist zunächst auf drei Jahre begrenzt. Nach zwei Jahren werden die Mitglieder des CEN gebeten, ihre Stellungnahmen abzugeben, insbesondere über die Frage, ob die CEN/TS in eine Europäische Norm umgewandelt werden kann.

Die CEN Mitglieder sind verpflichtet, das Vorhandensein dieser CEN/TS in der gleichen Weise wie bei einer EN anzukündigen und die CEN/TS verfügbar zu machen. Es ist zulässig, entgegenstehende nationale Normen bis zur Entscheidung über eine mögliche Umwandlung der CEN/TS in eine EN (parallel zur CEN/TS) beizubehalten.

CEN-Mitglieder sind die nationalen Normungsinstitute von Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, den Niederlanden, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, der Republik Nordmazedonien, Rumänien, Schweden, der Schweiz, Serbien, der Slowakei, Slowenien, Spanien, der Tschechischen Republik, der Türkei, Ungarn, dem Vereinigten Königreich und Zypern.



EUROPÄISCHES KOMITEE FÜR NORMUNG  
EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION  
COMITÉ EUROPÉEN DE NORMALISATION

CEN-CENELEC Management-Zentrum: Rue de la Science 23, B-1040 Brüssel

Inhalt

|                                                                                                                             | Seite |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Europäisches Vorwort . . . . .                                                                                              | 5     |
| Vorwort . . . . .                                                                                                           | 6     |
| Einleitung . . . . .                                                                                                        | 7     |
| 1 Anwendungsbereich . . . . .                                                                                               | 8     |
| 2 Normative Verweisungen . . . . .                                                                                          | 9     |
| 3 Begriffe . . . . .                                                                                                        | 9     |
| 4 Kurzbeschreibung . . . . .                                                                                                | 10    |
| 4.1 Allgemeines . . . . .                                                                                                   | 10    |
| 4.2 Anreicherung in einem flüssigen Selektivmedium . . . . .                                                                | 10    |
| 4.3 Isolierung auf einem festen Selektivmedium . . . . .                                                                    | 10    |
| 4.4 Bestätigung . . . . .                                                                                                   | 10    |
| 5 Nährmedien und Reagenzien . . . . .                                                                                       | 10    |
| 6 Geräte und Verbrauchsmaterialien . . . . .                                                                                | 10    |
| 7 Probenahme . . . . .                                                                                                      | 11    |
| 8 Vorbereitung der Untersuchungsprobe . . . . .                                                                             | 11    |
| 9 Durchführung . . . . .                                                                                                    | 12    |
| 9.1 Allgemeines . . . . .                                                                                                   | 12    |
| 9.2 Prüfmenge und Erstverdünnung . . . . .                                                                                  | 12    |
| 9.3 Selektive Anreicherung . . . . .                                                                                        | 12    |
| 9.4 Isolierung . . . . .                                                                                                    | 12    |
| 9.5 Bestätigung von <i>C. perfringens</i> . . . . .                                                                         | 13    |
| 9.5.1 Selektion von Kolonien für die Bestätigung . . . . .                                                                  | 13    |
| 9.5.2 Prüfung auf saure Phosphatase . . . . .                                                                               | 13    |
| 9.5.3 Prüfung mittels Sulfit-Indol-Motilität-Agar (SIM-Agar) . . . . .                                                      | 14    |
| 9.5.4 Differenzierung zwischen humanpathogenen und nichtpathogenen<br><i>C. perfringens</i> -Stämmen (optional) . . . . .   | 14    |
| 9.5.5 Auswertung . . . . .                                                                                                  | 14    |
| 10 Angabe der Ergebnisse . . . . .                                                                                          | 14    |
| 11 Indikative Leistungsmerkmale des Verfahrens . . . . .                                                                    | 14    |
| 11.1 Validierung basierend auf den Grundsätzen von ISO 17468 . . . . .                                                      | 14    |
| 11.2 Indikative Leistungsmerkmale . . . . .                                                                                 | 14    |
| 12 Untersuchungsbericht . . . . .                                                                                           | 17    |
| 13 Qualitätssicherung . . . . .                                                                                             | 18    |
| Anhang A (normativ) Fließschema des Verfahrens . . . . .                                                                    | 19    |
| Anhang B (normativ) Nährmedien und Reagenzien . . . . .                                                                     | 20    |
| B.1 Allgemeines . . . . .                                                                                                   | 20    |
| B.2 Rapid-Perfringens-Medium (RPM) . . . . .                                                                                | 20    |
| B.2.1 Rapid-Perfringens-Grundmedium . . . . .                                                                               | 20    |
| B.2.2 Neomycin-Polymyxin-Lösung . . . . .                                                                                   | 21    |
| B.2.3 Milchpulverlösung . . . . .                                                                                           | 21    |
| B.2.4 Vollständiges Rapid-Perfringens-Medium (RPM) . . . . .                                                                | 21    |
| B.3 Tryptose-Sulfit-Cycloserin-Agar (TSC-Agar) . . . . .                                                                    | 22    |
| B.3.1 Basismedium . . . . .                                                                                                 | 22    |
| B.3.2 D-Cycloserinlösung . . . . .                                                                                          | 22    |
| B.3.3 Vollständiges Medium . . . . .                                                                                        | 23    |
| B.4 Lactose-Eigelb-Neomycin-Agar (LENA) . . . . .                                                                           | 23    |
| B.4.1 Lactose-Agar-Grundmedium . . . . .                                                                                    | 23    |
| B.4.2 Neomycinlösung . . . . .                                                                                              | 23    |
| B.4.3 Eigelb-Emulsion (Konzentration von etwa 20 % (z. B. 200 ml/l) oder nach den<br>Anweisungen des Herstellers) . . . . . | 24    |
| B.4.4 Vollständiger Lactose-Eigelb-Neomycin-Agar . . . . .                                                                  | 24    |

B.5 Columbia-Blutagar (CBA) . . . . . 24

B.5.1 Columbia-Blutagar-Grundmedium . . . . . 24

B.5.2 Defibriniertes Blut (Pferde- oder Schafsblut) . . . . . 25

B.5.3 Vollständiges Grundmedium . . . . . 25

B.6 Reagenz für saure Phosphatase . . . . . 25

B.6.1 Zusammensetzung . . . . . 25

B.6.2 Herstellung . . . . . 26

B.7 Sulfit-Indol-Motilität-Agar (SIM-Agar) . . . . . 26

B.7.1 Zusammensetzung . . . . . 26

B.7.2 Herstellung . . . . . 26

B.8 Kovacs-Reagenz . . . . . 26

B.8.1 Zusammensetzung . . . . . 26

B.8.2 Herstellung . . . . . 27

B.9 Leistungsprüfung . . . . . 27

Anhang C (informativ) Indikative Leistungsmerkmale des Verfahrens mit Verwendung von TSC-Isolierungsagar und Prüfung auf saure Phosphatase zur Bestätigung . . . . . 29

Anhang D (informativ) Indikative Leistungsmerkmale des Verfahrens mit Verwendung von TSC-Isolierungsagar und Prüfung mittels SIM-Agar . . . . . 34

Anhang E (informativ) Indikative Leistungsmerkmale des Verfahrens mit Verwendung von LENA-Isolierungsagar und Prüfung auf saure Phosphatase zur Bestätigung . . . . . 39

Anhang F (informativ) Indikative Leistungsmerkmale des Verfahrens mit Verwendung von LENA-Isolierungsagar und Prüfung mittels SIM-Agar zur Bestätigung . . . . . 44

Anhang G (informativ) Molekulare Differenzierung zwischen pathogenen und nichtpathogenen *Clostridium perfringens* . . . . . 49

Literaturhinweise . . . . . 50

Bilder

Bild A.1 — Fließschema des Verfahrens zum Nachweis von *C. perfringens* . . . . . 19

Tabellen

Tabelle 1 — Übersicht über die indikativen LOD<sub>50</sub>-Werte aus dem Ringversuch mit Verwendung von TSC-Isolierungsagar und Prüfung auf saure Phosphatase zur Bestätigung . . . . . 15

Tabelle 2 — Übersicht über die indikativen LOD<sub>50</sub>-Werte aus dem Ringversuch mit Verwendung von TSC-Isolierungsagar und Prüfung mittels SIM-Agar zur Bestätigung . . . . . 15

Tabelle 3 — Übersicht über die indikativen LOD<sub>50</sub>-Werte aus dem Ringversuch mit Verwendung von LENA-Isolierungsagar und Prüfung auf saure Phosphatase zur Bestätigung . . . . . 16

Tabelle 4 — Übersicht über die indikativen LOD<sub>50</sub>-Werte aus dem Ringversuch mit Verwendung von LENA-Isolierungsagar und Prüfung mittels SIM-Agar zur Bestätigung . . . . . 17

Tabelle B.1 — Leistungsprüfung zur Qualitätssicherung der Nährmedien/Reagenzien . . . . . 27

Tabelle C.1 — Ergebnisse der Datenanalyse von Fleisch in Dosen (Kategorie: verzehrfertige, aufwärmfertige Fleischprodukte) . . . . . 29

Tabelle C.2 — Ergebnisse der Datenanalyse von Eipulver (Kategorie: Eier und Eiprodukte) . . . . 30

Tabelle C.3 — Ergebnisse der Datenanalyse von Fisch in Dosen (Kategorie: verzehrfertige, aufwärmfertige Fischereiprodukte) . . . . . 30

Tabelle C.4 — Ergebnisse der Datenanalyse von Ananas in Dosen (Kategorie: verarbeitetes Obst und Gemüse) . . . . . 31

Tabelle C.5 — Ergebnisse der Datenanalyse von probiotischer Säuglingsnahrung (Kategorie: Säuglingsnahrung und Getreideprodukte für Kleinkinder) . . . . . 31

Tabelle C.6 — Ergebnisse der Datenanalyse von Fertigsuppe (Kategorie: Mehrkomponenten-Lebensmittel bzw. Mahlzeitkomponenten) . . . . . 32

Tabelle C.7 — Ergebnisse der Datenanalyse von Tuchproben (Kategorie: Umgebungsproben [Lebensmittel- oder Futtermittelproduktion]) . . . . . 33

Tabelle D.1 — Ergebnisse der Datenanalyse von Fleisch in Dosen (Kategorie: verzehrfertige, aufwärmfertige Fleischprodukte) . . . . . 34

Tabelle D.2 — Ergebnisse der Datenanalyse von Eipulver (Kategorie: Eier und Eiprodukte) . . . . 35

Tabelle D.3 — Ergebnisse der Datenanalyse von Fisch in Dosen (Kategorie: verzehrfertige, aufwärmfertige Fischereiprodukte) . . . . . 35

Tabelle D.4 — Ergebnisse der Datenanalyse von Ananas in Dosen (Kategorie: verarbeitetes Obst und Gemüse) . . . . . 36

Tabelle D.5 — Ergebnisse der Datenanalyse von probiotischer Säuglingsnahrung (Kategorie: Säuglingsnahrung und Getreideprodukte für Kleinkinder) . . . . . 36

Tabelle D.6 — Ergebnisse der Datenanalyse von Fertigsuppe (Kategorie: Mehrkomponenten-Lebensmittel bzw. Mahlzeitkomponenten) . . . . . 37

Tabelle D.7 — Ergebnisse der Datenanalyse von Tuchproben (Kategorie: Umgebungsproben [Lebensmittel- oder Futtermittelproduktion]) . . . . . 38

Tabelle E.1 — Ergebnisse der Datenanalyse von Fleisch in Dosen (Kategorie: verzehrfertige, aufwärmfertige Fleischprodukte) . . . . . 39

Tabelle E.2 — Ergebnisse der Datenanalyse von Eipulver (Kategorie: Eier und Eiprodukte) . . . . 40

Tabelle E.3 — Ergebnisse der Datenanalyse von Fisch in Dosen (Kategorie: verzehrfertige, aufwärmfertige Fischereiprodukte) . . . . . 40

Tabelle E.4 — Ergebnisse der Datenanalyse von Ananas in Dosen (Kategorie: verarbeitetes Obst und Gemüse) . . . . . 41

Tabelle E.5 — Ergebnisse der Datenanalyse von probiotischer Säuglingsnahrung (Kategorie: Säuglingsnahrung und Getreideprodukte für Kleinkinder) . . . . . 41

Tabelle E.6 — Ergebnisse der Datenanalyse von Fertigsuppe (Kategorie: Mehrkomponenten-Lebensmittel bzw. Mahlzeitkomponenten) . . . . . 42

Tabelle E.7 — Ergebnisse der Datenanalyse von Tuchproben (Kategorie: Umgebungsproben [Lebensmittel- oder Futtermittelproduktion]) . . . . . 43

Tabelle F.1 — Ergebnisse der Datenanalyse von Fleisch in Dosen (Kategorie: verzehrfertige, aufwärmfertige Fleischprodukte) . . . . . 44

Tabelle F.2 — Ergebnisse der Datenanalyse von Eipulver (Kategorie: Eier und Eiprodukte) . . . . 45

Tabelle F.3 — Ergebnisse der Datenanalyse von Fisch in Dosen (Kategorie: verzehrfertige, aufwärmfertige Fischereiprodukte) . . . . . 45

Tabelle F.4 — Ergebnisse der Datenanalyse von Ananas in Dosen (Kategorie: verarbeitetes Obst und Gemüse) . . . . . 46

Tabelle F.5 — Ergebnisse der Datenanalyse von probiotischer Säuglingsnahrung (Kategorie: Säuglingsnahrung und Getreideprodukte für Kleinkinder) . . . . . 46

Tabelle F.6 — Ergebnisse der Datenanalyse von Fertigsuppe (Kategorie: Mehrkomponenten-Lebensmittel bzw. Mahlzeitkomponenten) . . . . . 47

Tabelle F.7 — Ergebnisse der Datenanalyse von Tuchproben (Kategorie: Umgebungsproben [Lebensmittel- oder Futtermittelproduktion]) . . . . . 48

## **Europäisches Vorwort**

Dieses Dokument (CEN ISO/TS 15213-3:2024) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 463 „Mikrobiologie der Lebensmittelkette“ erarbeitet, dessen Sekretariat von AFNOR gehalten wird.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. CEN ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

Dieses Dokument wurde im Rahmen eines Normungsauftrages erarbeitet, den die Europäische Kommission CEN erteilt hat. Der Ständige Ausschuss der EFTA-Staaten genehmigt anschließend diese Aufträge für die Mitgliedsstaaten.

Rückmeldungen oder Fragen zu diesem Dokument sollten an das jeweilige nationale Normungsinstitut des Anwenders gerichtet werden. Eine vollständige Liste dieser Institute ist auf den Internetseiten von CEN abrufbar.

Entsprechend der CEN-CENELEC-Geschäftsordnung sind die nationalen Normungsinstitute der folgenden Länder gehalten, diese Technische Spezifikation zu übernehmen: Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, die Republik Nordmazedonien, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, Niederlande, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, Schweiz, Serbien, Slowakei, Slowenien, Spanien, Tschechische Republik, Türkei, Ungarn, Vereinigtes Königreich und Zypern.

### **Anerkennungsnotiz**

Der Text von ISO/TS 15213-3:2024 wurde von CEN als CEN ISO/TS 15213-3:2024 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

## Vorwort

ISO (die Internationale Organisation für Normung) ist eine weltweite Vereinigung nationaler Normungsinstitute (ISO-Mitgliedsorganisationen). Die Erstellung von Internationalen Normen wird üblicherweise von Technischen Komitees von ISO durchgeführt. Jede Mitgliedsorganisation, die Interesse an einem Thema hat, für welches ein Technisches Komitee gegründet wurde, hat das Recht, in diesem Komitee vertreten zu sein. Internationale staatliche und nichtstaatliche Organisationen, die in engem Kontakt mit ISO stehen, nehmen ebenfalls an der Arbeit teil. ISO arbeitet bei allen elektrotechnischen Normungsthemen eng mit der Internationalen Elektrotechnischen Kommission (IEC) zusammen.

Die Verfahren, die bei der Entwicklung dieses Dokuments angewendet wurden und die für die weitere Pflege vorgesehen sind, werden in den ISO/IEC Directives, Teil 1, beschrieben. Es sollten insbesondere die unterschiedlichen Annahmekriterien für die verschiedenen ISO-Dokumentenarten beachtet werden. Dieses Dokument wurde in Übereinstimmung mit den Gestaltungsregeln der ISO/IEC Directives, Teil 2, erarbeitet (siehe [www.iso.org/directives](http://www.iso.org/directives)).

ISO weist auf die Möglichkeit hin, dass die Anwendung dieses Dokuments mit der Verwendung eines oder mehrerer Patente verbunden sein kann. ISO bezieht jedoch in dieser Hinsicht keinerlei Stellung bezüglich Nachweis, Gültigkeit oder Anwendbarkeit jeglicher beanspruchten Patentrechte. Zum Zeitpunkt der Veröffentlichung dieses Dokuments lag ISO keine Mitteilung über ein Patent bzw. mehrere Patente vor, welche/s zur Umsetzung dieses Dokuments erforderlich sein könnte/n. Anwender werden jedoch darauf hingewiesen, dass dies möglicherweise nicht der aktuelle Informationsstand ist. Dieser kann jedoch der Patentdatenbank unter [www.iso.org/patents](http://www.iso.org/patents) entnommen werden. ISO ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

Jeder in diesem Dokument verwendete Handelsname dient nur zur Unterrichtung der Anwender und bedeutet keine Anerkennung.

Für eine Erläuterung des freiwilligen Charakters von Normen, der Bedeutung ISO-spezifischer Begriffe und Ausdrücke in Bezug auf Konformitätsbewertungen sowie Informationen darüber, wie ISO die Grundsätze der Welthandelsorganisation (WTO, en: World Trade Organization) hinsichtlich technischer Handelshemmnisse (TBT, en: Technical Barriers to Trade) berücksichtigt, siehe [www.iso.org/iso/foreword.html](http://www.iso.org/iso/foreword.html).

Dieses Dokument wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34, *Food products*, Unterkomitee SC 9, *Microbiology*, in Zusammenarbeit mit dem Europäischen Komitee für Normung (CEN), Technisches Komitee CEN/TC 463, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette*, in Übereinstimmung mit der Vereinbarung zur technischen Zusammenarbeit zwischen ISO und CEN (Wiener Vereinbarung) erarbeitet.

Eine Auflistung aller Teile der Normenreihe ISO 15213 ist auf der ISO-Internetseite abrufbar.

Rückmeldungen oder Fragen zu diesem Dokument sollten an das jeweilige nationale Normungsinstitut des Anwenders gerichtet werden. Eine vollständige Auflistung dieser Institute ist unter [www.iso.org/members.html](http://www.iso.org/members.html) zu finden.

## Einleitung

*Clostridium (C.) perfringens* ist ein grampositives, anaerobes, sporenbildendes Bakterium. Als ubiquitär verbreitetes Bakterium ist *C. perfringens* überwiegend im Erdboden, aber auch im Darmtrakt von Mensch und Tier vorhanden. Daher kann die Anwesenheit vieler *C. perfringens* ein Hinweis auf eine ungeeignete Zubereitung oder Handhabung von Lebensmitteln sein.

Große Mengen von *C. perfringens* in verzehrfertigen Lebensmitteln können bei Menschen Krankheiten verursachen, vor allem Durchfall. Die Stämme werden nach ihrer Fähigkeit, verschiedene sogenannte „Major“- und „Minor“-Toxine zu produzieren, in Toxintypen klassifiziert. Lebensmittelvergiftungen im Zusammenhang mit *C. perfringens* werden meist durch *C. perfringens*-Isolate verursacht, die in der Lage sind, *C. perfringens*-Enterotoxin (CPE) zu produzieren.

Ein charakteristisches Merkmal ist die Hitzebeständigkeit der Sporen; sie haben die Fähigkeit, nach dem Kochprozess in verzehrfertigen Lebensmitteln zu keimen und sich zu vermehren. Auf den Verzehr kontaminierter Lebensmittel folgt eine Magen-Darm-Erkrankung, wenn während der Sporenbildung im Dünndarm enzymresistente *C. perfringens*-Enterotoxine freigesetzt werden. Die Stämme werden in verschiedene Typen klassifiziert.

Dieses Dokument beschreibt das horizontale Verfahren für den Nachweis von *C. perfringens* in Lebensmitteln, Futtermitteln, Umgebungsproben und Proben aus der Primärproduktion. Das Verfahren für die Zählung von sulfitreduzierenden *Clostridium* spp. ist in ISO 15213-1 beschrieben, während ISO 15213-2 das Verfahren für die Zählung von *C. perfringens* beschreibt. Diese drei Teile sind als Reihe Internationaler Normen veröffentlicht, da die Verfahren eng miteinander verbunden sind. Diese Verfahren werden häufig in Verbindung miteinander in einem Labor durchgeführt.

## 1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt den Nachweis von *Clostridium (C.) perfringens* fest.

Dieses Dokument ist anwendbar für:

- Produkte, die für den menschlichen Verzehr vorgesehen sind;
- Produkte, die als Futtermittel vorgesehen sind;
- Umgebungsproben im Bereich der Herstellung und Handhabung von Lebensmitteln und Futtermitteln;
- Proben aus dem Bereich der Primärproduktion.

Dieses horizontale Verfahren wurde ursprünglich für die Untersuchung aller Proben aus der Lebensmittelkette entwickelt. Basierend auf den zum Zeitpunkt der Veröffentlichung dieses Dokuments verfügbaren Informationen wird dieses Verfahren als für die Untersuchung aller Proben aus der Lebensmittelkette uneingeschränkt geeignet angesehen. Aufgrund der großen Produktvielfalt in der Lebensmittelkette ist es jedoch möglich, dass dieses horizontale Verfahren nicht bis ins Detail für alle Produkte geeignet ist. Dennoch wird erwartet, dass erforderliche Änderungen so gering gehalten werden, dass sie nicht zu einer signifikanten Abweichung von diesem horizontalen Verfahren führen.

**ANMERKUNG** Ringversuche mit einer geringen Anzahl von teilnehmenden Laboren (< 10) wurden für die folgenden Lebensmittelkategorien durchgeführt:

- verzehrfertige, aufwärmfertige Fleischprodukte;
- Eier und Eiprodukte (Derivate);
- verzehrfertige, aufwärmfertige Fischereiprodukte;
- verarbeitetes Obst und Gemüse;
- Säuglingsnahrung und Getreideprodukte für Kleinkinder (mit Probiotika);
- Mehrkomponenten-Lebensmittel bzw. Mahlzeitkomponenten.

Außerdem wurde eine Validierung mit einer geringen Anzahl von teilnehmenden Laboren für die folgende weitere Kategorie durchgeführt:

- Umgebungsproben (Lebensmittel- oder Futtermittelproduktion).

Da das Verfahren üblicherweise nicht für Proben in der Primärproduktion verwendet wird, wurde diese Kategorie nicht in den Ringversuch aufgenommen. Daher wurden für diese Kategorie keine Leistungsmerkmale ermittelt. Für die Kategorie „(Heim-)Tierfuttermittel“ wurde das Verfahren nicht validiert, da die für den Ringversuch verwendeten Untersuchungsproben bereits eine natürliche Kontamination mit *C. perfringens* aufwiesen. Angesichts der begrenzten Anzahl der Labore, die an dem Ringversuch teilgenommen haben, können die berechneten Leistungsmerkmale als indikative Werte für die Verfahrensleistung genutzt werden. Abschnitt 11 und Anhang C bis Anhang F enthalten detaillierte Informationen zur Validierung.

**WARNUNG** — Zum Schutz der Gesundheit des Laborpersonals ist es unerlässlich, dass Prüfungen zum Nachweis von *Clostridium perfringens* nur in Laboren mit geeigneter Ausstattung und unter der Leitung eines qualifizierten Mikrobiologen erfolgen und dass bei der Entsorgung allen bebrüteten Materials mit äußerster Vorsicht vorgegangen wird. Personen, die dieses Dokument anwenden, sollten mit der üblichen Laborpraxis vertraut sein. Dieses Dokument erhebt nicht den Anspruch, alle gegebenenfalls zutreffenden Sicherheitsaspekte im Zusammenhang mit seiner Anwendung zu behandeln. Es liegt in der Verantwortung des Anwenders, angemessene Sicherheits- und Schutzmaßnahmen zu treffen.

## 2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente werden im Text in solcher Weise in Bezug genommen, dass einige Teile davon oder ihr gesamter Inhalt Anforderungen des vorliegenden Dokuments darstellen. 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).

ISO 6887 (alle Teile), *Microbiology of the food chain — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination*

ISO 7218, *Microbiology of the food chain — General requirements and guidance for microbiological examinations*

ISO 11133, *Microbiology of food, animal feed and water — Preparation, production, storage and performance testing of culture media*

## 3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

ISO und IEC stellen terminologische Datenbanken für die Verwendung in der Normung unter den folgenden Adressen bereit:

- ISO Online Browsing Platform: verfügbar unter <https://www.iso.org/obp>
- IEC Electropedia: verfügbar unter <https://www.electropedia.org/>

### 3.1

**präsumtive *C. perfringens***

**präsumtive *Clostridium perfringens***

sporenbildende Bakterien, die auf einem spezifischen selektiven Medium unter obligat anaeroben Bedingungen typische Kolonien bilden

Anmerkung 1 zum Begriff: Präsumtive *C. perfringens* sind sporenbildende Bakterien, die unter den in diesem Dokument festgelegten Bedingungen in der Lage sind, typische Kolonien zu bilden.

### 3.2

**bestätigte *C. perfringens***

**bestätigte *Clostridium perfringens***

Bakterien, die auf dem angegebenen selektiven Medium unter obligat anaeroben Bedingungen charakteristische Kolonien bilden und entweder über das Enzym saure Phosphatase verfügen oder in der Lage sind, Sulfid zu produzieren, nicht in der Lage sind, Indol zu produzieren und nicht motil sind (SIM-Agar)

### 3.3

**humanpathogene *C. perfringens***

**humanpathogene *Clostridium perfringens***

bestätigte *C. perfringens* (3.2)-Stämme, die die Fähigkeit haben, *C. perfringens*-Enterotoxin (CPE) zu produzieren, das durch das *cpe*-Gen codiert wird

Anmerkung 1 zum Begriff: Das *cpe*-Gen kann entweder chromosomal oder auf großen Plasmiden lokalisiert sein. Diese Isolate sind in der Lage, bei Sporenbildung im Dünndarm CPE zu produzieren und Krankheiten beim Menschen zu verursachen.

### 3.4

#### Nachweis von *C. perfringens*

#### Nachweis von *Clostridium perfringens*

Bestimmung bestätigter *C. perfringens* (3.2) in einer bestimmten Masse, einem bestimmten Produktvolumen, einer bestimmten Fläche oder einem bestimmten Objekt im Rahmen der Durchführung einer festgelegten Prüfung

Anmerkung 1 zum Begriff: Festgelegte Prüfungen sind in Abschnitt 9 beschrieben.

## 4 Kurzbeschreibung

### 4.1 Allgemeines

Für den Nachweis von *C. perfringens* sind drei aufeinanderfolgende Verfahrensschritte erforderlich, wie in Anhang A angegeben.

### 4.2 Anreicherung in einem flüssigen Selektivmedium

Ein selektives Nährmedium (bei Umgebungstemperatur) wird mit einer festgelegten Menge der Untersuchungsprobe beimpft, wenn es sich bei dem Ausgangsprodukt um eine Flüssigkeit handelt, oder mit einer festgelegten Menge einer Erstverdünnung, wenn es sich um andere Produkte handelt. Das beimpfte Selektivmedium wird bei 46 °C für 18 h bebrütet.

### 4.3 Isolierung auf einem festen Selektivmedium

Mit den in 4.2 erhaltenen Kulturen werden zwei selektive Plattenmedien beimpft. Die Platten werden bei 37 °C bzw. bei 46 °C für 24 h anaerob bebrütet.

### 4.4 Bestätigung

Es werden Bestätigungsprüfungen durchgeführt. Das Ergebnis wird als Nachweis von *C. perfringens* oder Nicht-Nachweis von *C. perfringens* in einem bestimmten Probenvolumen ausgedrückt. Zusätzlich kann das in Anhang G genannte Verfahren für die molekulare Differenzierung zwischen nichtpathogenen und humanpathogenen *C. perfringens*-Stämmen verwendet werden.

## 5 Nährmedien und Reagenzien

Aktuelle Laborpraktiken nach ISO 7218 befolgen. Die Zusammensetzung von Nährmedien und Reagenzien sowie deren Herstellung sind in Anhang B festgelegt. Für die Leistungsprüfung von Nährmedien die Verfahren nach ISO 11133 und Anhang B befolgen.

## 6 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Ausstattung zum Einmalgebrauch mit geeigneten Kennwerten ist eine annehmbare Alternative zu wiederverwendbaren Glasgeräten. Die übliche Ausstattung mikrobiologischer Labore (siehe ISO 7218) und insbesondere Folgendes muss verwendet werden.

**6.1 Geeignetes Gerät zum Herstellen einer anaeroben Atmosphäre,** ein Gefäß, das hermetisch verschlossen werden kann, oder eine andere geeignete Vorrichtung, die es ermöglicht, während der gesamten Dauer der Bebrütung eines Nährmediums Bedingungen mit anaerober Atmosphäre aufrechtzuerhalten. Andere Systeme mit vergleichbarer Funktion, wie z. B. Anaerobkammern, dürfen verwendet werden. Die Herstelleranweisungen zu Installation und Wartung werden befolgt.

Die erforderliche Zusammensetzung der Atmosphäre kann durch die Zugabe eines Gasgemischs (z. B. aus einer Gasflasche) nach Evakuierung der Luft aus dem Gefäß, durch Verdrängung der Atmosphäre in einer Kammer oder durch andere geeignete Mittel (wie handelsübliche Gaspackungen) erreicht werden. Im Allgemeinen

erfordert eine anaerobe Bebrütung eine Atmosphäre mit einem Volumenanteil von Sauerstoff von weniger als 1 % und einem Volumenanteil von Kohlendioxid von 9 % bis 13 %.

**6.2 Gerät für die Trockensterilisation (Heißluft-Sterilisator) oder Dampfsterilisation (Autoklav).**

**6.3 Trocken- oder Wärmeschränk,** belüftet, geeignet für den Betrieb zwischen 25 °C und 50 °C.

**6.4 Gefrierschränke,** geeignet für den Betrieb bei  $-20\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$  und unter  $-70\text{ °C}$ .

**6.5 Brutschrank/Brutschränke,** geeignet für den Betrieb bei  $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ ,  $46\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ .

**6.6 pH-Messgerät,** mit einer Fehlergrenze von  $\pm 0,1$  pH-Einheiten bei 25 °C.

**6.7 Kühltisch,** geeignet für den Betrieb bei  $5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ .

**6.8 Sterile Flaschen, Kolben oder Röhrchen,** mit geeignetem Nennvolumen. Es dürfen Flaschen, Kolben oder Röhrchen mit ungiftigen Schraubverschlüssen aus Metall oder Kunststoff verwendet werden.

**6.9 Sterile Messpipetten oder automatische Pipetten,** mit 10 ml und 1 ml Nennvolumen.

**6.10 Sterile Impfüfen,** mit einem Durchmesser von etwa 3 mm (10 µl Volumen) und einem Volumen von 1 µl, oder Impfnadel oder Impfdraht.

**6.11 Sterile Petrischalen,** mit einem Durchmesser von etwa 90 mm.

**6.12 Thermostatisch geregeltes Wasserbad,** auf 44 °C bis 47 °C einstellbar.

## 7 Probenahme

Die Probenahme ist nicht Bestandteil des in diesem Dokument festgelegten Verfahrens. Die spezifische Internationale Norm, die sich mit dem betreffenden Produkt befasst, befolgen. Liegt keine spezifische Internationale Norm vor, die sich mit der Probenahme des betreffenden Produkts befasst, wird den Beteiligten empfohlen, diesbezüglich eine Vereinbarung zu treffen.

Empfohlene Probenahmeverfahren sind in den folgenden Dokumenten angegeben:

- ISO/TS 17728 für Lebensmittel und Futtermittel;
- ISO 707 für Milch und Milcherzeugnisse;
- ISO 6887-3 für rohe Weichtiere, Manteltiere und Stachelhäuter aus Primärproduktionsbereichen;
- ISO 13307 für Primärproduktion;
- ISO 17604 für Schlachttierkörper;
- ISO 18593 für Oberflächen.

Es ist wichtig, dass das Labor eine Probe erhält, die für das betrachtete Produkt repräsentativ ist. Die Probe sollte während des Transports oder der Lagerung nicht beschädigt oder verändert worden sein.

## 8 Vorbereitung der Untersuchungsprobe

Die Untersuchungsprobe wird aus der Laborprobe nach der spezifischen Internationalen Norm, die sich mit dem betreffenden Produkt befasst, vorbereitet. Die in der Normenreihe ISO 6887 festgelegten Verfahren werden befolgt.

Liegt keine spezifische Internationale Norm vor, wird den Beteiligten empfohlen, diesbezüglich eine Vereinbarung zu treffen.

## **9 Durchführung**

### **9.1 Allgemeines**

Es muss das Verfahren nach Anhang A befolgt werden.

### **9.2 Prüfmenge und Erstverdünnung**

Die Verfahren nach der Normenreihe ISO 6887 und der spezifischen Internationalen Norm, die sich mit dem betreffenden Produkt befasst, befolgen.

Falls das betreffende Produkt nicht flüssig ist, eine Erstverdünnung herstellen. 1 ml (6.9) der flüssigen Probe oder 1 ml (6.9) der Erstverdünnung (0,1 g Produkt) in 9 ml Rapid-Perfringens-Medium (RPM, B.2) geben. Alternativ 10 ml (6.9) der flüssigen Probe oder der Erstverdünnung (1 g Produkt) in 90 ml RPM (B.12) geben.

Wenn es erforderlich ist, eine große Anzahl von Proben zu untersuchen, besteht die Möglichkeit des Zusammensetzens oder Poolens von Proben desselben Typs. Die Untersuchung einer großen Anzahl von Proben kann notwendig sein, um die mikrobiologische Qualität einer großen Produktcharge von Umgebungsproben widerzuspiegeln, oder erforderlich sein, um regionale Rechtsvorschriften zu erfüllen.

Gleichermaßen dürfen mehrere Prüfmengen gepooled und unter Verwendung größerer Medienmengen gemeinsam untersucht werden, oder die aus den Prüfmengen erhaltenen (Vor-)Anreicherungskulturen gepooled und einer einzigen Prüfung unterzogen werden. Diese Verfahren zum Poolen sind in ISO 6887-1 beschrieben. Ob das Poolen von Proben eines bestimmten Typs möglich ist, muss nach der in ISO 6887-1 beschriebenen Verfahrensanweisung verifiziert werden.

**ANMERKUNG** Die Validierung dieses Verfahrens kann nach den entsprechenden Dokumenten in ISO 16140 (alle Teile) durchgeführt werden.

### **9.3 Selektive Anreicherung**

Die selektive Anreicherungsbouillon RPM in verschlossenen Röhrchen oder Flaschen (9.2) bei 46 °C (6.5) für 18 h ± 2 h bebrüten.

### **9.4 Isolierung**

Die selektiven Plattenmedien (B.3 und B.4) ruhen lassen, bis sie sich an die Raumtemperatur angepasst haben, falls sie bei einer niedrigeren Temperatur gelagert wurden. Die Oberfläche der Platten gegebenenfalls vor der Verwendung in einem Trocken- oder Wärmeschränk (6.3) trocknen (siehe ISO 11133).

Mithilfe einer 10-µl-Impföse (6.10) die Oberfläche des Selektivmediums Tryptose-Sulfit-Cycloserin-Agar (TSC-Agar, B.3) in einer Petrischale (6.11) und die Oberfläche des Selektivmediums Lactose-Eigelb-Neomycin-Agar (LENA, B.4) in einer Petrischale (6.11) mit der in 9.3 erhaltenen selektiven Anreicherungskultur beimpfen.

Die TSC-Agar-Platten bei 37 °C für 24 h ± 2 h in einem Brutschrank (6.5) anaerob (6.1) bebrüten. Die LENA-Platten bei 46 °C für 24 h ± 2 h in einem Brutschrank (6.5) anaerob (6.1) bebrüten.

**ANMERKUNG** Nach der Beimpfung der TSC-Agar-Platten kann eine Überschichtung mit TSC-Agar verwendet werden, um die Entwicklung von schwärmenden Kolonien auf der Oberfläche des Mediums zu verhindern. Etwa 5 ml des TSC-Mediums (siehe Abschnitt B.3) als Überschichtung in die Petrischalen gießen und anschließend auf einer kalten horizontalen Fläche ruhen lassen, bis die Überschichtung sich verfestigt hat.

## 9.5 Bestätigung von *C. perfringens*

### 9.5.1 Selektion von Kolonien für die Bestätigung

**9.5.1.1** Typische Kolonien auf TSC-Agar weisen eine schwarze oder graue bis gelbbraune Färbung auf, auch wenn die Farbe blass ist.

Typische Kolonien auf LENA weisen eine gelbe Färbung (Milchsäuregärung) und Ausfällung (Lecithinase-Reaktion) auf.

Nach der Entnahme der TSC-Agar-Platten aus der anaeroben Atmosphäre müssen die Kolonien innerhalb von 30 min untersucht werden, da die Farbe der Kolonien unter Sauerstoffexposition schnell verblassen und verschwinden kann. Wenn anaerobe Gefäße verwendet werden, sollten die Platten Gefäß für Gefäß oder in kleinen Mengen überprüft werden, wenn die Bebrütung in einem anaeroben Brutschrank (6.1, 6.5) durchgeführt wurde.

Zur Bestätigung fünf präsumtive *C. perfringens*-Kolonien aus jeder der Schalen nehmen, die typische Kolonien enthalten (siehe 9.4). Wenn unter den Kolonien mehr als eine Morphologie vorhanden ist, je Morphologie eine Kolonie zur Anlage einer Subkultur und zur Bestätigung auswählen.

**9.5.1.2** Die Platten ruhen lassen, bis sie sich an die Raumtemperatur angepasst haben, falls sie bei einer niedrigeren Temperatur gelagert wurden. Die Oberfläche der Platten gegebenenfalls vor der Verwendung trocknen (siehe ISO 11133).

Jede der selektierten Kolonien mit einer sterilen Impfföse (6.10) auf eine nicht selektive Blutagarplatte, z. B. Columbia-Blutagar (B.5) streichen. Wenn kein Blut zur Verfügung steht, kann Columbia-Grundmedium oder ein anderes nährstoffreiches Medium (z. B. Trypton-Soja-Agar oder Hirn-Herz-Infusionsagar) mit oder ohne Blut verwendet werden. Mehrere Isolate können auf gekennzeichnete Bereiche einer nicht selektiven Agarplatte gestrichen werden. Ausstriche sollten eindeutig voneinander getrennte Kolonien hervorbringen.

Die Platten in einer anaeroben Atmosphäre (6.1) bei 37 °C (6.5) für 20 h ± 2 h bebrüten. Unmittelbar nach der Bebrütung frisch gewachsene Kolonien, die eindeutig voneinander getrennt sind, zur Bestätigung selektieren. Die Bestätigung darf entweder durch Prüfung auf saure Phosphatase (9.5.2) oder mittels Sulfid-Indol-Motilität-Agar (SIM-Agar) (9.5.3) durchgeführt werden.

**ANMERKUNG** Alternative Verfahren (siehe ISO 7218) können verwendet werden, um zu bestätigen, ob es sich bei den typischen Kolonien um *C. perfringens* handelt, sofern die Eignung des alternativen Verfahrens validiert wurde (siehe ISO 16140-4 oder ISO 16140-6).

Nach der Bebrütung können diese Platten für eine Höchstdauer von 48 h bei 5 °C (6.7) bis zur Untersuchung gekühlt gelagert werden. Bei Platten, die anaerob bebrütet wurden, die anaerobe Atmosphäre aufrechterhalten.

### 9.5.2 Prüfung auf saure Phosphatase

**9.5.2.1** Es ist bekannt, dass neben *C. perfringens* auch einige andere *Clostridium*-Stämme (z. B. einige Stämme von *C. baratii*) saure Phosphatase produzieren können, jedoch ist diese Fähigkeit stark eingeschränkt. Daher wird nur ein sehr geringer Prozentsatz an falsch-positiven Ergebnissen erwartet.

**9.5.2.2** Anaerob auf Blut- oder Nähragarplatten gezüchtete Kolonien auf Filterpapier ausbreiten und 2 bis 3 Tropfen des Reagenz für saure Phosphatase (B.6) auf die Kolonien geben. Bei Verwendung von handelsüblichen Test-Kits die Herstelleranweisungen befolgen.

**ANMERKUNG** Das Träufeln von Reagenz für saure Phosphatase auf Kolonien ist möglich, wenn keine weitere Untersuchung der Kolonien erforderlich ist.

**9.5.2.3** Eine violette Farbe, die sich innerhalb von 3 min bis 4 min entwickelt, wird als positive Reaktion angesehen.