

	DIN EN ISO 15213-2	
ICS 07.100.30	Ersatz für DIN EN ISO 7937:2004-11	
Mikrobiologie der Lebensmittelkette – Horizontales Verfahren zum Nachweis und zur Zählung von <i>Clostridium</i> spp. – Teil 2: Zählung von <i>Clostridium perfringens</i> durch Koloniezählverfahren (ISO 15213-2:2023); Deutsche Fassung EN ISO 15213-2:2023 Microbiology of the food chain – Horizontal method for the detection and enumeration of <i>Clostridium</i> spp. – Part 2: Enumeration of <i>Clostridium perfringens</i> by colony-count technique (ISO 15213-2:2023); German version EN ISO 15213-2:2023 Microbiologie de la chaîne alimentaire – Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de <i>Clostridium</i> spp. – Partie 2: Dénombrement de <i>Clostridium perfringens</i> par la technique de comptage des colonies (ISO 15213-2:2023); Version allemande EN ISO 15213-2:2023		
Gesamtumfang 61 Seiten		
DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)		

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN ISO 15213-2:2023) 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“ des Arbeitsausschusses „Mikrobiologie der Lebensmittelkette“ im DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL).

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 16140-2	siehe	DIN EN ISO 16140-2
ISO 16140-4	siehe	DIN EN ISO 16140-4
ISO 16140-6	siehe	DIN EN ISO 16140-6
ISO 17468	siehe	DIN EN ISO 17468
ISO 17604	siehe	DIN EN ISO 17604
ISO/TS 17728	siehe	DIN CEN ISO/TS 17728
ISO 18593	siehe	DIN EN ISO 18593
ISO 19036:2019	siehe	DIN EN ISO 19036:2020-05*
ISO 22118	siehe	DIN EN ISO 22118
ISO 22119	siehe	DIN EN ISO 22119
ISO 22174	siehe	DIN EN ISO 22174

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

Änderungen

Gegenüber DIN EN ISO 7937:2004-11 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) der Anwendungsbereich wurde auf Proben aus dem Bereich der Primärproduktion erweitert;

* Entspricht der aktuellen deutschen Fassung zum Zeitpunkt der Veröffentlichung.

- b) die Hitzebehandlung von 10 min bei 80 °C ist optional, falls die Begleitflora stark ausgeprägt ist oder falls ausschließlich Sporen von *Clostridium perfringens* in der Probe gezählt werden;
- c) das selektive Nährmedium wurde von Sulfite-Cycloserin-Agar (SC) zu Tryptose-Sulfite-Cycloserin-Agar (TSC-Agar) umbenannt, ohne Änderung an der Formulierung;
- d) die enthaltenen Bestätigungsverfahren wurden nach ISO 14189 geändert;
- e) ein Fließschemata in Anhang A gibt eine Kurzbeschreibung des Verfahrens;
- f) in Anhang B wurden Kriterien für die Leistungsprüfung von Nährmedien hinzugefügt;
- g) in Anhang C (informativ) wurden die Leistungsmerkmale hinzugefügt;
- h) in Anhang D (informativ) wurden zwei molekulare Verfahren zur Differenzierung zwischen pathogenem und nichtpathogenem *C. perfringens* und ein molekulares Verfahren zur Differenzierung von *C. perfringens*-Stämmen vom Typ A, die ein chromosomal codiertes *cpe*-Gen bzw. ein plasmidcodiertes *cpe*-Gen aufweisen, hinzugefügt.

Frühere Ausgaben

DIN EN 13401: 1999-06

DIN EN ISO 7937: 2004-11

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN CEN ISO/TS 17728, *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 16140-2, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Verfahrensvalidierung — Teil 2: Arbeitsvorschrift für die Validierung von alternativen (urheberrechtlich geschützten) Verfahren anhand eines Referenzverfahrens*

DIN EN ISO 16140-4, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Verfahrensvalidierung — Teil 4: Arbeitsvorschrift für Einzel-Labor-Verfahrensvalidierung*

DIN EN ISO 16140-6, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Verfahrensvalidierung — Teil 6: Arbeitsvorschrift für die Validierung von (urheberrechtlich geschützten) Alternativverfahren für die Bestätigungs- und Typisierungsprüfung*

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

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*

DIN EN ISO 19036:2020-05*, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Feststellung von Messunsicherheiten bei quantitativen Bestimmungen (ISO 19036:2019); Deutsche Fassung EN ISO 19036:2019*

DIN EN ISO 22118, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis und zur quantitativen Bestimmung von pathogenen Mikroorganismen in Lebensmitteln — Leistungsmerkmale*

DIN EN ISO 22119, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Real-time-Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis von pathogenen Mikroorganismen in Lebensmitteln — Allgemeine Anforderungen und Begriff*

DIN EN ISO 22174, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis von pathogenen Mikroorganismen in Lebensmitteln — Allgemeine Anforderungen und Begriffe*

– Leerseite –

Deutsche Fassung

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)

Microbiology of the food chain —
Horizontal method for the detection and enumeration
of *Clostridium* spp. —
Part 2: Enumeration of *Clostridium perfringens* by
colony-count technique (ISO 15213-2:2023)

Microbiologie de la chaîne alimentaire —
Méthode horizontale pour la recherche et le
dénombrement de *Clostridium* spp. —
Partie 2: Dénombrement de *Clostridium perfringens* par
la technique de comptage des colonies
(ISO 15213-2:2023)

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 12. September 2023 angenommen.

Die CEN-Mitglieder sind gehalten, die CEN/CENELEC-Geschäftsordnung zu erfüllen, in der die Bedingungen festgelegt sind, unter denen dieser Europäischen Norm ohne jede Änderung der Status einer nationalen Norm zu geben ist. Auf dem letzten Stand befindliche Listen dieser nationalen Normen mit ihren bibliographischen Angaben sind beim CEN-CENELEC-Management-Zentrum oder bei jedem CEN-Mitglied auf Anfrage erhältlich.

Diese Europäische Norm besteht in drei offiziellen Fassungen (Deutsch, Englisch, Französisch). Eine Fassung in einer anderen Sprache, die von einem CEN-Mitglied in eigener Verantwortung durch Übersetzung in seine Landessprache gemacht und dem Management-Zentrum mitgeteilt worden ist, hat den gleichen Status wie die offiziellen Fassungen.

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	8
1 Anwendungsbereich	9
2 Normative Verweisungen	10
3 Begriffe	10
4 Kurzbeschreibung	11
4.1 Allgemeines	11
4.2 Herstellung von Verdünnungen	11
4.3 Zählung	11
4.4 Bestätigung	12
5 Nährmedien und Reagenzien	12
6 Geräte und Verbrauchsmaterialien	12
7 Probenahme	12
8 Herstellung der Untersuchungsprobe	13
9 Durchführung	13
9.1 Allgemeines	13
9.2 Prüfmenge, Erstverdünnung und Verdünnungen	13
9.3 Hitzebehandlung zur Selektion von Sporen	13
9.4 Beimpfung und Bebrütung	14
9.5 Zählung typischer Kolonien	14
9.6 Bestätigung von <i>C. perfringens</i>	15
9.6.1 Selektion von Kolonien für die Bestätigung	15
9.6.2 Prüfung auf saure Phosphatase	15
9.6.3 Prüfung mittels Sulfid-Indol-Motilität-Agar (SIM-Agar)	16
9.6.4 Differenzierung zwischen humanpathogenen und nichtpathogenen <i>C. perfringens</i> -Stämmen (optional)	16
9.6.5 Interpretation	16
10 Angabe der Ergebnisse	16
11 Validierung des Verfahrens	16
11.1 Ringversuch	16
11.2 Leistungsmerkmale	17
12 Untersuchungsbericht	18
13 Qualitätssicherung	18
Anhang A (normativ) Fließschema des Verfahrens	19
Anhang B (normativ) Nährmedien und Reagenzien	21
B.1 Allgemeines	21
B.2 Tryptose-Sulfid-Cycloserin-Agar (TSC-Agar) [18]	21
B.2.1 Basismedium	21
B.2.2 D-Cycloserinlösung	22
B.2.3 Vollständiges Medium	22
B.3 Columbia-Blutagar (CBA)	22
B.3.1 Columbia-Blutagar-Grundmedium	22
B.3.2 Defibriniertes Blut (Pferde- oder Schafsblut)	23
B.3.3 Vollständiges Grundmedium	23
B.4 Reagenz für saure Phosphatase	23
B.4.1 Zusammensetzung	23
B.4.2 Herstellung	23
B.5 Sulfid-Indol-Motilität-Agar (SIM-Agar)	24
B.5.1 Zusammensetzung	24
B.5.2 Herstellung	24

B.6	Kovacs-Reagenz	24
B.6.1	Zusammensetzung	24
B.6.2	Herstellung	24
B.7	Leistungsprüfung	24
Anhang C (informativ)	Verfahrensvalidierungsstudien und Leistungsmerkmale	27
Anhang D (informativ)	Molekulare Differenzierung zwischen pathogenen und nichtpathogenen <i>C. perfringens</i>	31
D.1	Allgemeines	31
D.2	Gel-basierter Multiplex-PCR-Assay zur Differenzierung von <i>C. perfringens</i>	31
D.2.1	Leistungsmerkmale (siehe ISO 22118)	31
D.2.2	Geräte und Reagenzien	33
D.3	Real-time-Multiplex-PCR-Assay zur Differenzierung von <i>C. perfringens</i>	39
D.3.1	Leistungsmerkmale (siehe ISO 22118)	39
D.3.2	Geräte und Reagenzien	41
D.4	Multiplex-PCR-Assay zur Differenzierung von chromosomal codierten <i>cpe</i> -Genen und plasmidcodierten <i>cpe</i> -Genen	45
D.4.1	Leistungsmerkmale (siehe ISO 22118)	45
D.4.2	Geräte und Reagenzien	47
Literaturhinweise		54

Bilder

Bild A.1	Fließschema des Koloniezählverfahrens für <i>C. perfringens</i>	20
----------	---	----

Tabellen

Tabelle 1	Zusammenfassung der s_r -Werte aus dem Ringversuch	17
Tabelle 2	Zusammenfassung der s_R -Werte aus dem Ringversuch	17
Tabelle B.1	Leistungsprüfung zur Qualitätssicherung der Nährmedien und Reagenzien	25
Tabelle C.1	Ergebnisse der Datenanalyse von Fertigsuppe (Kategorie: Mehrkomponenten-Lebensmittel bzw. Mahlzeitkomponenten)	27
Tabelle C.2	Ergebnisse der Datenanalyse von Ananas in Dosen (Kategorie: verarbeitetes Obst und Gemüse)	28
Tabelle C.3	Ergebnisse der Datenanalyse von Umweltaustrichen (Kategorie: Umgebungsproben [Lebensmittel- oder Futtermittelproduktion])	28
Tabelle C.4	Ergebnisse der Datenanalyse von Füttersilage (Kategorie: (Heim-)Tierfuttermittel)	28
Tabelle C.5	Ergebnisse der Datenanalyse von Fisch in Dosen (Kategorie: verzehrfertige, aufwärmfertige Fischereiprodukte)	29
Tabelle C.6	Ergebnisse der Datenanalyse von Corned Beef in Dosen (Kategorie: verzehrfertige, aufwärmfertige Fleischprodukte)	29
Tabelle C.7	Ergebnisse der Datenanalyse von Säuglingsnahrung in Pulverform (Kategorie: Säuglingsnahrung und Getreideprodukte für Kleinkinder)	30
Tabelle D.1	Toxino- und entsprechende Genotypen von <i>C. perfringens</i> [22]	31
Tabelle D.2	Inklusivität der Multiplex-PCR mit Zielstämmen	32
Tabelle D.3	Exklusivität der Multiplex-PCR mit Nicht-Zielstämmen	32
Tabelle D.4	Sequenzen von Oligonukleotiden	34
Tabelle D.5	MasterMix	37
Tabelle D.6	Temperatur-Zeit-Programm	38
Tabelle D.7	Größe der Amplifikationsprodukte	39
Tabelle D.8	Inklusivität der Multiplex-PCR mit Zielstämmen	40
Tabelle D.9	Exklusivität der Multiplex-PCR mit Nicht-Zielstämmen	40
Tabelle D.10	Sequenzen von Oligonukleotiden	41
Tabelle D.11	MasterMix (Triplex-Real-time-PCR-System, <i>cpa</i> -Gen, <i>cpe</i> -Gen und IAC)	43

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)	44
Tabelle D.13 — Temperatur-Zeit-Programm	44
Tabelle D.14 — Inklusivität der Multiplex-PCR mit Zielstämmen	45
Tabelle D.15 — Exklusivität der Multiplex-PCR mit Nicht-Zielstämmen	46
Tabelle D.16 — Sequenzen von Oligonukleotiden	47
Tabelle D.17 — MasterMix	50
Tabelle D.18 — Temperatur-Zeit-Programm	51
Tabelle D.19 — Größe der Amplifikationsprodukte	52

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (EN ISO 15213-2:2023) 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.

Diese Europäische Norm muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis Mai 2024, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Mai 2024 zurückgezogen werden.

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 ersetzt EN ISO 7937:2004.

Dieses Dokument wurde im Rahmen eines Normungsauftrages erarbeitet, den die Europäische Kommission und die Europäische Freihandelsassoziation CEN erteilt haben.

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 Europäische Norm 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 15213-2:2023 wurde von CEN als EN ISO 15213-2:2023 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).

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 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.

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.

Diese erste Ausgabe von ISO 15213-2 ersetzt ISO 7937:2004, die technisch überarbeitet wurde.

Die wesentlichen Änderungen sind folgende:

- der Anwendungsbereich wurde auf Proben aus dem Bereich der Primärproduktion erweitert;
- die Hitzebehandlung von 10 min bei 80 °C wird optional, falls die Begleitflora stark ausgeprägt ist oder falls ausschließlich Sporen von *Clostridium (C.) perfringens* in der Probe gezählt werden;
- das selektive Nährmedium wurde ohne Veränderung der Rezeptur von Sulfit-Cycloserin-Agar (SC) in Tryptose-Sulfit-Cycloserin-Agar (TSC-Agar) umbenannt;
- die beschriebenen Bestätigungsverfahren wurden an ISO 14189 angepasst;

- das Fließschema im normativen Anhang A, das eine kurze Beschreibung des Verfahrens enthält, wurde überarbeitet;
- in Anhang B wurden Kriterien für die Leistungsprüfung von Nährmedien hinzugefügt;
- in Anhang C (informativ) wurden die Leistungsmerkmale hinzugefügt;
- in Anhang D (informativ) wurden zwei molekulare Verfahren zur Differenzierung zwischen pathogenem und nichtpathogenem *C. perfringens* und ein molekulares Verfahren zur Differenzierung von *C. perfringens*-Stämmen vom Typ A, die ein chromosomal codiertes *cpe*-Gen bzw. ein plasmidcodiertes *cpe*-Gen aufweisen, hinzugefügt.

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 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 Diarrhoe. Die Stämme werden nach ihrer Fähigkeit, verschiedene sogenannte „Major“- und „Minor“-Toxine zu produzieren, in Toxintypen klassifiziert. Lebensmittelvergiftungen werden 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 die Zählung 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. Das Verfahren für den Nachweis von *C. perfringens* ist in ISO/TS 15213-3 beschrieben. 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 und die Medien und ihre Leistungsmerkmale können ähnlich sein.

Die im Vorwort aufgezählten wesentlichen technischen Änderungen gegenüber ISO 7937:2004, die in diesem Dokument eingeführt werden, gelten als erheblich (siehe ISO 17468).

Diese Änderungen haben einen erheblichen Einfluss auf die Leistungsmerkmale des Verfahrens.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt die Zählung von *Clostridium (C.) perfringens* mit dem Koloniezählverfahren fest.

Dieses Dokument ist anwendbar für:

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

ANMERKUNG Dieses Verfahren wurde in einem Ringversuch für die folgenden Lebensmittelkategorien validiert:

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

Es wurde außerdem für die folgenden anderen Kategorien validiert:

- (Heim-)Tierfuttermittel;
- Umgebungsproben (Lebensmittel- oder Futtermittelproduktion).

Da dieses Verfahren für mindestens fünf Lebensmittelkategorien validiert wurde, ist es für ein breites Spektrum von Lebensmitteln anwendbar. Abschnitt 11 und Anhang C enthalten detaillierte Informationen zur Validierung. 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.

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.

Dieses Verfahren eignet sich unter anderem für die Zählung von Mikroorganismen in Untersuchungsproben mit mindestens 10 gezählten Kolonien auf einer Platte. Dies entspricht einem erwarteten Kontaminationsgrad von mehr als 10 KBE/ml bei flüssigen Proben bzw. mehr als 100 KBE/g bei festen Proben.

WARNHINWEIS — Zum Schutz der Gesundheit des Laborpersonals ist es unerlässlich, dass Prüfungen mit Zählung 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*

ISO 19036:2019, *Microbiology of the food chain — Estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations*

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 in einem spezifischen selektiven Medium unter obligat anaeroben Bedingungen zählbare 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 im angegebenen selektiven Medium unter obligat anaeroben Bedingungen charakteristische Kolonien bilden und über das Enzym saure Phosphatase verfügen

3.3

humanpathogene *C. perfringens*

humanpathogene *Clostridium perfringens*

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

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

3.4

Zählung von *C. perfringens*

Zählung von *Clostridium perfringens*

Bestimmung der Anzahl koloniebildender Einheiten (KBE) von *bestätigten C. perfringens* (3.2), die bei Durchführung einer festgelegten Prüfung je Gramm, je Milliliter, je Quadratzentimeter oder je Probenahmeverrichtung gefunden werden

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

4 Kurzbeschreibung

4.1 Allgemeines

Bei Anwendung des Plattengussverfahrens wird eine festgelegte Menge einer flüssigen Untersuchungsprobe bzw. bei anderen Produkten einer Erstverdünnung in eine leere Petrischale gegeben und mit einem festgelegten geschmolzenen Nähragar gut vermischt. Unter gleichen Bedingungen und unter Anwendung von Dezimalverdünnungen der Untersuchungsprobe werden weitere Platten vorbereitet. Nach der Verfestigung des Agarmediums wird eine Überschichtung verwendet, um die Entwicklung von schwärmenden Kolonien (auch als Laufkolonie bezeichnet) auf der Oberfläche des Mediums zu verhindern. Wenn beabsichtigt ist, nur die Sporen zu zählen, wird vor dem Ausplattieren eine Hitzebehandlung von 10 min bei 80 °C durchgeführt. Zusätzlich ist in Anhang D ein Verfahren für die molekulare Differenzierung zwischen humanpathogenen und nichtpathogenen *C. perfringens*-Stämmen beschrieben.

Wenn erwartet wird, dass die Anzahl der KBE an oder nahe der Bestimmungsgrenze liegt, werden vorzugsweise zwei Platten verwendet. Wenn zwei Platten verwendet werden, sollte die Summe der Kolonien auf beiden Platten mindestens 10 Kolonien betragen. In diesem Fall wird erwartet, dass der Kontaminationsgrad bei flüssigen Proben höher als 5 KBE/ml und bei festen Proben höher als 50 KBE/g ist.

Ein Plattengussverfahren mit Überschichtung ist insbesondere für die Zählung von Produkten geeignet, von denen erwartet wird, dass sie schwärmende Kolonien enthalten, die die Kolonien der Zielmikroorganismen verdecken können.

Für die Zählung von *C. perfringens* sind vier aufeinanderfolgende Verfahrensschritte erforderlich, wie im normativen Anhang A angegeben.

4.2 Herstellung von Verdünnungen

Für die Herstellung von Dezimalverdünnungen aus der Prüfmenge wird das in der Normenreihe ISO 6887 festgelegte Verfahren angewandt.

4.3 Zählung

Petrischalen werden mit einer festgelegten Menge der Untersuchungsprobe beimpft, wenn es sich bei dem Ausgangsprodukt um eine Flüssigkeit handelt, oder mit einer festgelegten Menge der Erstverdünnung, wenn es sich um andere Produkte handelt. Unter gleichen Bedingungen und unter Anwendung von Dezimalverdünnungen der Untersuchungsprobe oder der Erstverdünnung werden zusätzliche Petrischalen beimpft. Ein selektives Medium wird hinzugefügt (Plattengussverfahren) und dann mit demselben Medium überschichtet.

Die Platten werden unter anaeroben Bedingungen 20 h bei 37 °C bebrütet. Nach der Bebrütung wird die Anzahl der typischen Kolonien, die eine schwarze oder graue bis gelbbraune Färbung aufweisen, ermittelt. Die Färbung der Kolonien und des umgebenden Bereichs verändert sich durch die Bildung von Eisen(II)-sulfid infolge der Reaktion zwischen Sulfidionen und im Medium vorhandenem dreiwertigem Eisen [Fe(III)].

4.4 Bestätigung

Es werden Bestätigungsprüfungen durchgeführt. Das Ergebnis wird als Koloniezahl bestätigter *C. perfringens* je Probenvolumen berechnet. Zusätzlich kann das in Anhang D beschriebene Verfahren für die molekulare Differenzierung zwischen humanpathogenen und nichtpathogenen *C. perfringens*-Stämmen verwendet werden.

5 Nährmedien und Reagenzien

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

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 Gaspäckungen) erreicht werden. Im Allgemeinen erfordert eine anaerobe Bebrütung eine Atmosphäre mit einem Volumenanteil an Sauerstoff von weniger als 1 % und einem Volumenanteil an Kohlendioxid von 9 % bis 13 %.

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

6.3 Gefrierschrank, geeignet für den Betrieb bei $-20\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ und $-70\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$.

6.4 Brutschrank, geeignet für den Betrieb bei $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$.

6.5 pH-Messgerät mit einer Fehlergrenze der Kalibrierung von $\pm 0,1$ pH-Einheiten bei 25 °C .

6.6 Kühlschrank, geeignet für den Betrieb bei $5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$.

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

6.8 Sterile Messpipetten oder automatische Pipetten, mit 10 ml, 1 ml und 0,1 ml Nennvolumen.

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

6.10 Sterile Petrischalen mit einem Durchmesser von etwa 90 mm und (optional) mit größerem Durchmesser (Durchmesser etwa 140 mm).

6.11 Thermostatisch geregeltes Wasserbad, auf 44 °C bis 47 °C und $80\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ 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, wird befolgt. Liegt keine spezifische Interna-

tionale 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 Herstellung 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, Erstverdünnung und Verdünnungen

Die Verfahren nach der Normenreihe ISO 6887 und der spezifischen Internationalen Norm, die sich mit dem betreffenden Produkt befasst, werden befolgt. Es wird eine Dezimalverdünnung hergestellt: bei flüssigen Produkten aus der Prüfmenge, bei anderen Produkten aus der Erstverdünnung.

9.3 Hitzebehandlung zur Selektion von Sporen

Wenn beabsichtigt ist, nur die Sporen zu zählen, wird die Dezimalverdünnungsreihe in einem Wasserbad (6.11) 10 min ± 1 min auf 80 °C erhitzt. Die Hitzebehandlung muss innerhalb von 15 min nach Herstellung der Erstverdünnung erfolgen, um eine Auskeimung der Sporen zu vermeiden. Wenn das Röhrchen nicht innerhalb von 15 min in das Wasserbad gegeben wird, sollte es unmittelbar für maximal 2 h in schmelzendes Eis gegeben werden.

Die Temperatur während der Hitzebehandlung sollte überwacht werden, indem ein geeignetes Thermometer in eine Referenzflasche von gleicher Größe wie die Probenflasche gestellt wird, die das gleiche Wasservolumen mit der gleichen Ausgangstemperatur wie die behandelte Probe enthält (6.7). Die Röhrchen sollten während der Hitzebehandlung nicht hermetisch verschlossen werden. Die zum Erreichen von 80 °C benötigte Zeit darf 5 min nicht überschreiten und kann minimiert werden, indem sichergestellt wird, dass der Wasserspiegel mindestens 4 cm über dem Niveau der Probe liegt und, dass das Wasserbad mit einer Umwälzpumpe ausgestattet ist, um die Wärmeübertragung zu maximieren.

Die Erwärmungszeit (10 min) wird gestartet, wenn die Temperatur der Referenzprobe 80 °C erreicht hat. Nach der Hitzebehandlung sollten die Proben sofort auf etwa 20 °C abgekühlt werden.