

DIN EN ISO 15213-2



ICS 07.100.30

Entwurf

Einsprüche bis 2022-11-02

Vorgesehen als
teilweiser Ersatz für
DIN EN ISO 7937:2004-11

**Mikrobiologie der Nahrungskette –
Horizontales Verfahren zum Nachweis und zur Aufzählung von
Clostridium spp. –
Teil 2: Zählung von Clostridium perfringens durch Koloniezählverfahren
(ISO/DIS 15213-2:2022);
Deutsche und Englische Fassung prEN ISO 15213-2:2022**

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/DIS 15213-2:2022);
German and English version prEN ISO 15213-2:2022

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 par comptage des
colonies (ISO/DIS 15213-2:2022);
Version allemande et anglaise prEN ISO 15213-2:2022

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2022-09-02 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und Stellungnahme vorgelegt.

Weil die beabsichtigte Norm von der vorliegenden Fassung abweichen kann, ist die Anwendung dieses Entwurfs besonders zu vereinbaren.

Stellungnahmen werden erbeten

- vorzugsweise online im Norm-Entwurfs-Portal von DIN unter www.din.de/go/entwuerfe bzw. für Norm-Entwürfe der DKE auch im Norm-Entwurfs-Portal der DKE unter www.entwuerfe.normenbibliothek.de, sofern dort wiedergegeben;
- oder als Datei per E-Mail an nal@din.de möglichst in Form einer Tabelle. Die Vorlage dieser Tabelle kann im Internet unter www.din.de/go/stellungnahmen-norm-entwuerfe oder für Stellungnahmen zu Norm-Entwürfen der DKE unter www.dke.de/stellungnahme abgerufen werden;
- oder in Papierform an den DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL), 10772 Berlin oder Am DIN-Platz, Burggrafenstr. 6, 10787 Berlin.

Die Empfänger dieses Norm-Entwurfs werden gebeten, mit ihren Kommentaren jegliche relevanten Patentrechte, die sie kennen, mitzuteilen und unterstützende Dokumentationen zur Verfügung zu stellen.

Gesamtumfang 102 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 15213-2:2022) 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).

Um Zweifelsfälle in der Übersetzung auszuschließen, ist die englische Originalfassung beigelegt. Die Nutzungsbedingungen für den deutschen Text des Norm-Entwurfes gelten gleichermaßen auch für den englischen Text.

Auf internationaler Ebene ersetzen ISO 15213-1, ISO 15213-2 und ISO 15213-3 zusammen ISO 15213:2003 und ISO 7937:2004. Da nur DIN EN ISO 7937:2004-11 Bestandteil des deutschen Normenwerkes ist, werden untenstehend nur die Änderungen gegenüber dieser aufgeführt.

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 (all parts)	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 16140-2	siehe	DIN EN ISO 16140-2
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 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;
- b) die Wärmebehandlung von 10 min bei 80 °C ist optional, falls die Hintergrundflora sehr hoch 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) 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) im informativen Anhang D werden zwei molekulare Verfahren zur Differenzierung zwischen pathogenen und nicht-pathogenen *C. perfringens* beschrieben und ein molekulares Verfahren zur Differenzierung zwischen *C. perfringens* Typ A Stämmen die entweder ein chromosomal kodiertes cpe Gen oder ein Plasmid kodiertes cpe Gen enthalten.

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

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

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

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

DIN EN ISO 7218, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Allgemeine Anforderungen und Leitlinien für mikrobiologische Untersuchungen (ISO 7218)*

DIN EN ISO 11133, *Mikrobiologie von Lebensmitteln, Futtermitteln und Wasser — Vorbereitung, Herstellung, Lagerung und Leistungsprüfung von Nährmedien (ISO 11133)*

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Mikrobiologie der Nahrungskette – Horizontales Verfahren zum Nachweis und zur Aufzählung von Clostridium spp. – Teil 2: Zählung von Clostridium perfringens durch Koloniezählverfahren (ISO/DIS 15213-2:2022)

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/DIS 15213-2:2022)

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 par comptage des colonies (ISO/DIS 15213-2:2022)

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	5
Vorwort	6
Einleitung	8
1 Anwendungsbereich	9
2 Normative Verweisungen	10
3 Begriffe	10
4 Kurzbeschreibung	10
4.1 Allgemeines	10
4.2 Herstellung von Verdünnungen	11
4.3 Zählung	11
4.4 Bestätigung	11
5 Nährmedien und Reagenzien	11
6 Geräte und Verbrauchsmaterialien	11
7 Probenahme	12
8 Herstellung der Untersuchungsprobe	12
9 Durchführung	12
9.1 Allgemeines	12
9.2 Prüfmenge, Erstverdünnung und Verdünnungen	13
9.3 Vorbehandlung durch Erwärmung zur Auswahl von Sporen	13
9.4 Beimpfung und Bebrütung	13
9.5 Zählung typischer Kolonien	14
9.6 Bestätigung von <i>C. perfringens</i>	14
9.6.1 Auswahl von Kolonien für die Bestätigung	14
9.6.2 Prüfung auf saure Phosphatase	15
9.6.3 Prüfung auf SIM-Agar	15
9.6.4 Differenzierung zwischen humanpathogenen und nichtpathogenen <i>C. perfringens</i> -Stämmen (optional)	15
9.6.5 Interpretation	15
10 Darstellung der Ergebnisse	15
11 Leistungsmerkmale des Verfahrens	16
11.1 Ringversuch	16
11.2 Wiederholgrenze	16
11.3 Vergleichsgrenze	16
12 Untersuchungsbericht	17
13 Qualitätssicherung	17
Anhang A (normativ) Fließschema des Verfahrens	19
Anhang B (normativ) Nährmedien und Reagenzien	20
B.1 Allgemeines	20
B.2 Tryptose-Sulfit-Cycloserin-Agar (TSC)	20
B.2.1 Basalmedium	20
B.2.2 D-Cycloserinlösung	21
B.2.3 Vollständiges Medium	21
B.3 Columbia-Blutagar (CBA)	21
B.3.1 Columbia-Blutagar-Grundmedium	21
B.3.2 Defibriniertes Blut (Pferde- oder Schafsblut)	22
B.3.3 Vollständiges Grundmedium	22
B.4 Reagenz für saure Phosphatase	22
B.4.1 Zusammensetzung	22
B.4.2 Herstellung	22
B.5 SIM-Agar-Röhrchen	23
B.5.1 Zusammensetzung	23

B.5.2	Herstellung	23
B.6	Kovacs-Reagenzien	23
B.6.1	Zusammensetzung	23
B.6.2	Herstellung	23
B.7	Leistungsprüfung	23
Anhang C	(informativ) Verfahrensvalidierungsstudien und Leistungsmerkmale	25
Anhang D	(informativ) Molekulare Differenzierung zwischen pathogenen und nichtpathogenen <i>C. perfringens</i>	29
D.1	Allgemeines	29
D.2	Gel-basierter Multiplex-PCR-Assay zur Differenzierung von <i>C. perfringens</i>	29
D.2.1	Leistungsmerkmale (siehe ISO 22118)	29
D.2.2	Geräte und Reagenzien	31
D.3	Echtzeit-Multiplex-PCR-Assay zur Differenzierung von <i>C. perfringens</i>	37
D.3.1	Leistungsmerkmale (siehe ISO 22118)	37
D.3.2	Geräte und Reagenzien	39
D.4	Multiplex-PCR-Assay zur Differenzierung von chromosomal codierten <i>cpe</i> -Genen und plasmidcodierten <i>cpe</i> -Genen	43
D.4.1	Leistungsmerkmale (siehe ISO 22118)	43
D.4.2	Geräte und Reagenzien	44
Literaturhinweise		51

Bilder

Bild A.1	Fließschema des Koloniezählverfahrens für <i>C. perfringens</i>	19
----------	---	----

Tabellen

Tabelle B.1	Leistungsprüfung zur Qualitätssicherung der Nährmedien	23
Tabelle C.1	Ergebnisse der Datenanalyse von Fertigsuppe [Kategorie: Mehrkomponenten-Lebensmittel bzw. Mahlzeitkomponenten]	25
Tabelle C.2	Ergebnisse der Datenanalyse von Ananas in Dosen [Kategorie: verarbeitetes Obst und Gemüse]	26
Tabelle C.3	Ergebnisse der Datenanalyse von Umweltaustrichen [Kategorie: Umgebungsproben (Lebensmittel- oder Futtermittelproduktion)]	26
Tabelle C.4	Ergebnisse der Datenanalyse von Füttersilage [Kategorie: (Heim-)Tierfuttermittel]	27
Tabelle C.5	Ergebnisse der Datenanalyse von Fisch in Dosen [Kategorie: verzehrfertige, aufwärmfertige Fischereiprodukte]	27
Tabelle C.6	Ergebnisse der Datenanalyse von Corned Beef in Dosen [Kategorie: verzehrfertige, aufwärmfertige Fleischprodukte]	28
Tabelle C.7	Ergebnisse der Datenanalyse von Säuglingsnahrung in Pulverform [Kategorie: Säuglingsnahrung und Getreideprodukte für Kleinkinder]	28
Tabelle D.1	Toxino- und entsprechende Genotypen von <i>C. perfringens</i> [18]	29
Tabelle D.2	Inklusivität der Multiplex-PCR mit Zielstämmen	30
Tabelle D.3	Exklusivität der Multiplex-PCR mit Nicht-Zielstämmen	30
Tabelle D.4	Sequenzen von Oligonukleotiden	32
Tabelle D.5	MasterMix	35
Tabelle D.6	Temperatur-Zeit-Programm	36
Tabelle D.7	Größe der Amplifikationsprodukte	37
Tabelle D.8	Inklusivität der Multiplex-PCR mit Zielstämmen	38
Tabelle D.9	Exklusivität der Multiplex-PCR mit Nicht-Zielstämmen	38
Tabelle D.10	Sequenzen von Oligonukleotiden	39
Tabelle D.11	MasterMix (Triplex-Echtzeit-PCR-System, <i>cpa</i> -Gen, <i>cpe</i> -Gen und IAC)	41

Tabelle D.12 — MasterMix (Duplex-Echtzeit-PCR-System, <i>cpb1</i> - und <i>cpb2</i> -Gen oder <i>etx</i> - und <i>iap</i> -Gen)	41
Tabelle D.13 — Temperatur-Zeit-Programm	42
Tabelle D.14 — Inklusivität der Multiplex-PCR mit Zielstämmen	43
Tabelle D.15 — Exklusivität der Multiplex-PCR mit Nicht-Zielstämmen	44
Tabelle D.16 — Sequenzen von Oligonukleotiden	45
Tabelle D.17 — MasterMix	48
Tabelle D.18 — Temperatur-Zeit-Programm	49
Tabelle D.19 — Größe der Amplifikationsprodukte	50

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 15213-2:2022) 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.

Dieses Dokument ist derzeit zur parallelen Umfrage vorgelegt.

Dieses Dokument wird EN ISO 7937:2004 ersetzen.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO/DIS 15213-2:2022 wurde von CEN als prEN ISO 15213-2:2022 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-Direktiven, 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-Direktiven, Teil 2 erarbeitet (siehe www.iso.org/directives).

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. ISO ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren. Details zu allen während der Entwicklung des Dokuments identifizierten Patentrechten finden sich in der Einleitung und/oder in der ISO-Liste der erhaltenen Patenterklärungen (siehe www.iso.org/patents).

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

Für eine Erläuterung zum freiwilligen Charakter 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, 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. ISO 15213-1 ersetzt ISO 15213:2003. ISO 15213:2003 und ISO 7937:2004 wurden technisch überarbeitet. ISO 15213-3 ist eine neu erarbeitete Norm.

Die wesentlichen Änderungen im Vergleich zur Vorgängerausgabe sind folgende:

- der Anwendungsbereich wurde auf Proben aus dem Bereich der Primärproduktion erweitert;
- die Wärmebehandlung von 10 min bei 80 °C wurde für den Fall einer hohen Begleitflora oder bei der abschließlichen Zählung von Sporen von *Clostridium (C.) perfringens* in der Probe optional gemacht;
- das selektive Medium wurde ohne Veränderung der Formulierung von Sulfit-Cycloserin-Agar (SC) in Tryptose-Sulfit-Cycloserin-Agar (TSC) umbenannt;
- die beschriebenen Bestätigungsverfahren sind nach ISO 14189 modifiziert;
- ein Flussdiagramm in Anhang A enthält eine kurze Beschreibung des Verfahrens;

- in Anhang D (informativ) werden zwei molekulare Verfahren zur Differenzierung zwischen pathogenem und nichtpathogenem *C. perfringens* und ein molekulares Verfahren zur Differenzierung von *C. perfringens*-Stämmen vom Typ A beschrieben, die ein chromosomal codiertes *cpe*-Gen bzw. ein plasmidcodiertes *cpe*-Gen beinhalten.

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 allgegenwärtiges Bakterium ist *C. perfringens* überwiegend im Boden, aber auch im Darmtrakt von Menschen und Tieren 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 werden durch *C. perfringens*-Isolate verursacht, die in der Lage sind, *C. perfringens*-Enterotoxin (CPE) zu produzieren.

Die Wärmebeständigkeit der Sporen ist ein charakteristisches Merkmal; 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 *Clostridium (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 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 gilt für:

- Produkte, die für den menschlichen Verzehr vorgesehen sind;
- Produkte für das Füttern von Tieren;
- 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 die erforderlichen Änderungen so gering sind, dass sie nicht zu einer signifikanten Abweichung von diesem horizontalen Verfahren führen.

Dieses Verfahren ist für die Zählung von Mikroorganismen in Untersuchungsproben geeignet, aber nicht darauf beschränkt, und basiert auf einer Anzahl von mindestens 10 gezählten Kolonien auf einer Platte. Dies entspricht einem erwarteten Kontaminationsgrad, der bei flüssigen Proben höher als 10 KBE/ml und bei festen Proben höher als 100 KBE/g ist.

WARNHINWEIS — Zum Schutz der Gesundheit des Laborpersonals ist es unerlässlich, dass Prüfungen mit Auszählung von *Clostridium perfringens* nur in Laboratorien mit geeigneter Ausstattung und unter der Leitung eines qualifizierten Mikrobiologen erfolgt und dass bei der Entsorgung allen inkubierten 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 (all parts), *Microbiology of the food chain — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination*

ISO 7218, *Microbiology of food and animal feeding stuffs — 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

bestätigte *Clostridium (C.) perfringens*

Bakterien, die im angegebenen selektiven Medium unter obligat anaeroben Bedingungen charakteristische Kolonien bilden und über das Enzym saure Phosphatase verfügen

3.2

humanpathogene *Clostridium (C.) perfringens*

bestätigte *C. perfringens*-Stämme, 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.

3.3

präsumtive *Clostridium (C.) 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.

4 Kurzbeschreibung

4.1 Allgemeines

Zur Bildung einer gegossenen Platte wird eine festgelegte Menge einer flüssigen Untersuchungsprobe bzw. bei anderen Produkten einer Erstverdünnung in einer leeren Petrischale aufgetragen und mit einem festgelegten geschmolzenen Nähragar gut vermischt. Unter gleichen Bedingungen und unter Anwendung von Dezimalverdünnungen der Untersuchungsprobe werden weitere Platten vorbereitet. Wenn beabsichtigt ist, nur die Sporen zu zählen, muss vor dem Ausplattieren eine Wärmebehandlung von 10 min bei 80 °C durchgeführt wer-

den. 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 mindestens 10 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 sich ausbreitende Kolonien enthalten, die die Kolonien der Zielmikroorganismen verdecken können.

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

4.2 Herstellung von Verdünnungen

Für die Herstellung von Dezimalverdünnungen aus der Prüfmenge wird das in ISO 6887 (alle Teile) festgelegte Verfahren befolgt.

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. Die Anzahl der Kolonien, bei denen es sich aufgrund ihres charakteristischen Aussehens vermutlich um *C. perfringens* handelt, wird aufgezeichnet.

4.4 Bestätigung

Es werden Bestätigungsprüfungen durchgeführt. Das Ergebnis wird als Koloniezahl bestätigter *C. perfringens* je Probenvolumen berechnet. Zusätzlich darf 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/oder Anhang B befolgt.

6 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Einweg-Geräte sind eine zulässige Alternative zu Mehrweg-Glasgeräten, wenn sie geeignete Kennwerte aufweisen. Die übliche Grundausstattung mikrobiologischer Labore (siehe ISO 7218) und insbesondere Folgendes muss verwendet werden:

6.1 Geeignete Geräte zum Herstellen einer anaeroben Atmosphäre.

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

- 6.5 Brutschrank/Brutschränke**, geeignet für den Betrieb bei $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$.
- 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, 1 ml und 0,1 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 und (optional) großer Größe (Durchmesser etwa 140 mm).
- 6.12 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. Es wird die spezifische Internationale Norm, die sich mit dem betreffenden Produkt befasst, befolgt. 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 Herstellung der Untersuchungsprobe

Die Untersuchungsprobe aus der Laborprobe wird nach der spezifischen Internationalen Norm, die sich mit dem betreffenden Produkt befasst, vorbereitet. Die in ISO 6887 (alle Teile) festgelegten Verfahren werden befolgt. Liegt keine spezifische Internationale Norm vor, wird den Beteiligten empfohlen, diesbezüglich eine Vereinbarung zu treffen.

9 Durchführung

9.1 Allgemeines

Ein Flussdiagramm ist in Anhang A dargestellt.

9.2 Prüfmenge, Erstverdünnung und Verdünnungen

Die Untersuchungsprobe wird nach der spezifischen Internationalen Norm, die sich mit dem betreffenden Produkt befasst, vorbereitet. Existiert keine spezifische Internationale Norm, wird den Beteiligten empfohlen, diesbezüglich eine Vereinbarung zu treffen. Es wird eine Dezimalverdünnung hergestellt: bei flüssigen Produkten aus der Prüfmenge, bei anderen Produkten aus der Erstverdünnung.

9.3 Vorbehandlung durch Erwärmung zur Auswahl von Sporen

Wenn beabsichtigt ist, nur die Sporen zu zählen, wird die Dezimalverdünnungsreihe in einem Wasserbad (6.12) 10 min $\pm$ 1 min auf 80 °C erwärmt. Die Wärmebehandlung muss innerhalb von 15 min nach Herstellung der Erstverdünnung erfolgen, um eine Keimung von 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 Wärmebehandlung 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 (6.8). Die Röhrchen sollten während der Wärmebehandlung nicht hermetisch verschlossen werden. Die zum Erreichen von 80 °C benötigte Zeit darf 10 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 Wasser im Wasserbad zirkuliert, um die Wärmeübertragung zu maximieren.

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

Die Wärmebehandlung sollte auch die konkurrierende Flora in einigen Matrices reduzieren, die ein hohes Maß an Begleitflora enthalten (z. B. Flüssigmolke, Silage).

9.4 Beimpfung und Bebrütung

9.4.1 Es werden zwei sterile Petrischalen mit einem Durchmesser von 90 mm (6.11) genommen. Mithilfe einer sterilen Pipette (6.9) wird in beide Petrischalen bei flüssigen Produkten jeweils 1 ml der Untersuchungsprobe bzw. bei anderen Produkten 1 ml der Erstverdünnung (10^{-1} -Verdünnung) gegeben. Wenn für mehr als eine Verdünnung Platten vorbereitet werden, darf dies auf eine Petrischale reduziert werden (siehe ISO 7218).

9.4.2 Es wird eine weitere sterile Petrischale (6.11) genommen. Mit einer weiteren sterilen Pipette (6.9) wird 1 ml der 10^{-1} -Verdünnung (bei flüssigem Produkt) bzw. 1 ml der 10^{-2} -Verdünnung (bei anderen Produkten) aufgetragen.

9.4.3 Gegebenenfalls wird das Verfahren mit weiteren Verdünnungen wiederholt, wobei für jede Dezimalverdünnung eine neue sterile Pipette (6.9) verwendet wird.

9.4.4 Wenn angemessen und möglich, werden nur die entscheidenden Verdünnungsstufen (mindestens zwei aufeinanderfolgende Dezimalverdünnungen), welche eine Koloniezahl zwischen 10 und 150 Kolonien je Platte (in Petrischalen von 90 mm Durchmesser) bzw. zwischen 10 und 360 Kolonien je Platte (in Petrischalen von 140 mm Durchmesser) ergeben, für die Beimpfung der Petrischalen (6.11) ausgewählt.

9.4.5 In jede 90-mm-Petrischale (6.11) werden etwa 12 ml bis 15 ml bzw. in jede 140-ml-Petrischale (6.11) werden etwa 45 ml bis 50 ml des bei 44 °C bis 47 °C (6.12) geschmolzenen und temperierten Tryptose-Sulfit-Cycloserin-Agarmediums (TSC) (siehe B.2) gegossen. Die Zeit zwischen dem Ende der Herstellung der Erstverdünnung (bzw. der 10^{-1} -Verdünnung bei flüssigem Produkt) und dem Moment, in dem das Medium (siehe B.2) in die Schalen gegossen wird, darf 45 min nicht überschreiten.

9.4.6 Das Inokulum wird durch Drehen der Petrischalen vorsichtig mit dem Medium gemischt, und das Gemisch wird zum Verfestigen in den Petrischalen (6.11) auf einer kalten horizontalen Fläche stehen gelassen.

9.4.7 Nach der vollständigen Verfestigung werden etwa 5 ml Medium (siehe B.2) in 90-mm-Petrischalen (6.11) bzw. 10 ml in 140-ml-Petrischalen (6.11) als Übersichtung eingegossen, um die Entwicklung von sich ausbreitenden Kolonien auf der Oberfläche des Mediums zu verhindern. Das Medium wird zum Festwerden wie in 9.4.6 festgelegt stehen gelassen.

9.4.8 Die Platten werden umgedreht und bei $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ für $20\text{ h} \pm 2\text{ h}$ in einer anaeroben Atmosphäre bebrütet (6.1, 6.3). Eine längere Bebrütung kann zu einer übermäßigen Schwärzung der Platten führen.

9.5 Zählung typischer Kolonien

9.5.1 Nach $20\text{ h} \pm 2\text{ h}$ Bebrütung werden die Platten (siehe 9.4.8) auf präsumtive *C. perfringens* untersucht.

Die typischen Kolonien, die auf dem TSC-Agar eine schwarze oder graue bis gelbbraune Färbung aufweisen (auch wenn die Farbe blass ist), werden gezählt.

Nach der Entnahme der Platten aus der anaeroben Atmosphäre müssen die Kolonien innerhalb von 30 min gezählt werden, da die Farbe der Kolonien unter Sauerstoffexposition schnell verblassen und verschwinden kann. Wenn anaerobe Behälter verwendet werden, sollten die Platten Behälter für Behälter oder in kleinen Mengen überprüft werden, wenn die Bebrütung in einem anaeroben Brutschrank (6.1, 6.3) durchgeführt wurde.

9.5.2 Platten (siehe 9.5.1), die weniger als 150 präsumtive Kolonien (bei Petrischalen von 90 mm Durchmesser) oder weniger als 360 Kolonien (bei Petrischalen von 140 mm Durchmesser) enthalten, werden ausgewählt; diese Kolonien werden gezählt und die Anzahl der präsumtiven Kolonien je Platte wird aufgezeichnet. Dann werden nach dem Zufallsprinzip fünf solcher Kolonien aus jeder Schale zur Bestätigung (9.6) ausgewählt. Zur Zählung von Platten mit geringer oder hoher Anzahl präsumtiver Kolonien siehe ISO 7218.

9.6 Bestätigung von *C. perfringens*

9.6.1 Auswahl von Kolonien für die Bestätigung

9.6.1.1 Zur Bestätigung werden fünf präsumtive Kolonien aus jeder der Schalen genommen, die zur Zählung (siehe 9.5.2) zurückbehalten wurden. Wenn unter den Kolonien mehr als eine Morphologie vorhanden ist, wird eine von jeder Morphologie zur Anlage einer Subkultur und zur Bestätigung ausgewählt.

9.6.1.2 Jede der ausgewählten Kolonien wird mit einer sterilen Schlaufe (6.9) auf eine nicht selektive Blutagarplatte, z. B. Columbia-Blutagar (siehe B.3) gestrichen. 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.

Die Platten werden dann an die Raumtemperatur angepasst, wenn sie bei einer niedrigeren Temperatur gelagert wurden. Die Oberfläche der Platten wird gegebenenfalls vor der Verwendung getrocknet (siehe ISO 11133). Mehrere Isolate können auf identifizierte Sektoren jeder der beiden nicht selektiven Agarplatten gestrichen werden. Ausstriche sollten gut voneinander getrennte Kolonien hervorbringen.

Die Platten werden in einer anaeroben Atmosphäre bei $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ (6.3) für $20\text{ h} \pm 2\text{ h}$ bebrütet. Unmittelbar nach der Bebrütung werden frisch gezüchtete Kolonien, die deutlich isoliert liegen, zur Bestätigung ausgewählt. Die Bestätigung darf entweder durch Prüfung auf saure Phosphatase oder SIM-Agar durchgeführt werden.

ANMERKUNG Alternative Verfahren können verwendet werden, um die Bestimmung des Isolats als *C. perfringens* zu bestätigen, sofern die Eignung des alternativen Verfahrens verifiziert wurde (siehe ISO 7218).

9.6.2 Prüfung auf saure Phosphatase

9.6.2.1 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.

9.6.2.2 Anaerob auf Blut- oder Nähragarplatten gezüchtete Kolonien werden auf Filterpapier ausgebreitet und 2 bis 3 Tropfen des sauren Phosphatasereagenzes (B.4) auf die Kolonien gegeben. Bei Verwendung von im Handel erhältlichen Test-Kits sind die Herstelleranweisungen zu befolgen.

ANMERKUNG Das Träufeln von saurem Phosphatasereagenz auf Kolonien ist möglich, wenn keine weitere Untersuchung der Kolonien erforderlich ist.

9.6.2.3 Eine violette Farbe, die sich innerhalb von 3 bis 4 Minuten entwickelt, wird als positive Reaktion angesehen.

9.6.3 Prüfung auf SIM-Agar

Auf Blutagarplatten anaerob gezüchtete Kolonien werden durch Einstechen in SIM-Röhrchen (B.5) eingebracht. Die Röhrchen werden für $22\text{ h} \pm 2\text{ h}$ bei $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ bebrütet. Nach dem Bebrüten werden die Röhrchen abgelesen:

- Sulfitproduktion: Röhrchen, die eine Schwärzung aufweisen, sind positiv.
- Motilität: Röhrchen, die Wachstum außerhalb des Beimpfungseinstichs aufweisen, sind positiv.
- Indolproduktion: Röhrchen, in denen unmittelbar nach Zugabe von Kovacs-Reagenzien (B.6) ein rot gefärbter Ring erscheint, sind positiv.

C. perfringens ist bei Sulfitproduktion positiv und bei Indolproduktion und Motilität negativ.

9.6.4 Differenzierung zwischen humanpathogenen und nichtpathogenen *C. perfringens*-Stämmen (optional)

Zusätzlich kann das in Anhang D beschriebene Verfahren für die molekulare Differenzierung zwischen humanpathogenen und nichtpathogenen *C. perfringens*-Stämmen verwendet werden.

9.6.5 Interpretation

C. perfringens führt auf TSC-Agar zu schwarzen oder grauen bis gelbbraunen Kolonien, deren Färbung möglicherweise blass ist, und enthält saure Phosphatase.

10 Darstellung der Ergebnisse

Für die Berechnung der Ergebnisse wird (werden) das (die) Verfahren nach ISO 7218 befolgt. Die Ergebnisse werden als die Anzahl bestätigter *C. perfringens* oder, wenn das Verfahren in Anhang D auch zur Differenzierung verwendet wurde, bestätigter humanpathogener *C. perfringens* in KBE je Gramm, je Millimeter oder je Quadratzentimeter berechnet und angegeben. Wenn der Bereich, aus dem die Probe stammt, nicht bekannt ist, wird nach der Probenahmeverrichtung, z. B. Tuch, Schwammpuffer oder Wattestäbchen, angegeben.

Wenn eine Vorbehandlung durch Erwärmung zur Auswahl von Sporen (9.3) durchgeführt wurde, werden die Ergebnisse als Anzahl bestätigter *C. perfringens*-Sporen angegeben oder, wenn das Verfahren in Anhang D auch zur Differenzierung verwendet wurde, werden bestätigte humanpathogene *C. perfringens*-Sporen in KBE je Gramm, je Millimeter, je Quadratzentimeter oder je Probenahmeverrichtung berechnet und angegeben.

In Fällen, in denen keine typischen Kolonien von *C. perfringens* nachgewiesen wurden, oder wenn keine typischen Kolonien als *C. perfringens* bestätigt werden, wird ISO 7218 für die Darstellung der Ergebnisse in Sonderfällen befolgt.

11 Leistungsmerkmale des Verfahrens

11.1 Ringversuch

Ergebnisse des Ringversuchs zur Bestimmung der Präzision des Verfahrens sind in Anhang C zusammengefasst. Wiederhol- und Vergleichsgrenzen wurden mit 5 Nahrungsmitteltypen, Umweltabstrichen und gering kontaminierter Futtersilage ermittelt. Es ist möglich, dass die aus dem Ringversuch abgeleiteten Werte nicht auf andere Konzentrationsbereiche und Nahrungsmitteltypen als die in Anhang C angegebenen anwendbar sind. Da dieses Verfahren für mindestens fünf Lebensmittelkategorien validiert wurde, ist es für ein breites Spektrum von Lebensmitteln anwendbar. Da das Verfahren üblicherweise nicht für Proben in der Primärproduktion verwendet wird, ist diese Kategorie nicht Teil der Validierungsstudie.

ANMERKUNG In diesem Dokument sind die Worte „Kategorie“, „Typ“ und/oder „Einheit“ manchmal mit „(Nahrungsmittel)“ kombiniert, um die Lesbarkeit zu verbessern. Das Wort „Nahrungsmittel“ ist jedoch mit „Futtermittel“ und anderen Bereichen der Lebensmittelkette austauschbar, wie in Abschnitt 1 erwähnt.

11.2 Wiederholgrenze

Die absolute Differenz von zwei voneinander unabhängigen ($\log_{10}$ -transformierten) Einzeluntersuchungsergebnissen (Anzahl der KBE je Gramm bzw. je Milliliter) oder das Verhältnis des höheren zum niedrigeren der beiden Untersuchungsergebnisse auf der üblichen Skala, die/das nach dem gleichen Verfahren an identischem Untersuchungsmaterial im selben Labor durch denselben Bearbeiter mit derselben Geräteausrüstung in möglichst kurzen Zeitabständen ermittelt wird, darf nicht in mehr als 5 % der Fälle größer sein als die Wiederholgrenze r .

Als allgemeiner Indikator für die Wiederholgrenze r dürfen bei der Untersuchung von Lebensmittelproben im Allgemeinen die folgenden Gesamtwerte (berechnet aus den Daten in Anhang C) verwendet werden:

- $r = 0,20$ (angegeben als Differenz zwischen $\log_{10}$ -transformierten Untersuchungsergebnissen); oder
- $r = 1,57$ (angegeben als ein Verhältnis zwischen Untersuchungsergebnissen).

BEISPIEL In einem bestimmten Labor wurde ein Untersuchungsergebnis von 10 000 bzw. $1,0 \times 10^4$ bzw. $\log_{10} 4,0$ KBE je Gramm Probenmaterial ermittelt. Unter Bedingungen der Wiederholpräzision sollte die Differenz zwischen $\log_{10}$ -transformierten Ergebnissen nicht größer als $\pm 0,20$ $\log_{10}$ -Einheiten sein. Es wird also erwartet, dass das Ergebnis einer zweiten Untersuchung der gleichen Probe zwischen 3,80 ($4,0 - 0,20$) und 4,20 ($4,0 + 0,20$) $\log_{10}$ -Einheiten liegt.

Bei nicht log-transformierten Ergebnissen sollte das Verhältnis zwischen dem ersten Untersuchungsergebnis und dem zweiten Prüfergebnis aus derselben Probe nicht größer als 1,57 sein. Es wird also erwartet, dass das zweite Untersuchungsergebnis zwischen 6 370 ($= 10\,000/1,57$) und 15 700 ($10\,000 \times 1,57$) KBE je Gramm liegt.

11.3 Vergleichsgrenze

Die absolute Differenz von zwei voneinander unabhängigen ($\log_{10}$ -transformierten) Einzeluntersuchungsergebnissen (Anzahl der KBE je Gramm bzw. je Milliliter) oder das Verhältnis des höheren zum niedrigeren der beiden Untersuchungsergebnisse auf der üblichen Skala, die/das nach dem gleichen Verfahren an identischem Untersuchungsmaterial in verschiedenen Laboren durch verschiedene Bearbeiter mit unterschiedlicher Geräteausrüstung ermittelt wird, darf nicht in mehr als 5 % der Fälle größer sein als die Vergleichsgrenze R .

Als allgemeiner Indikator für die Vergleichsgrenze R dürfen bei der Untersuchung von Lebensmittelproben im Allgemeinen die folgenden Gesamtwerte (berechnet aus den Daten in Anhang C) verwendet werden:

- $R = 1,36$ (angegeben als Differenz zwischen $\log_{10}$ -transformierten Untersuchungsergebnissen); oder
- $R = 22,68$ (angegeben als ein Verhältnis zwischen Untersuchungsergebnissen).

ANMERKUNG Das ermittelte R ist hoch, da die verschiedenen Teilnehmer große Varianzen für Corned Beef in Dosen festgestellt haben.

BEISPIEL 1 In einem bestimmten Labor wurde ein Untersuchungsergebnis von 10 000 bzw. $1,0 \times 10^4$ bzw. $\log_{10} 4,0$ KBE je Gramm Probenmaterial ermittelt. Unter Bedingungen der Vergleichpräzision sollte die Differenz zwischen $\log_{10}$ -transformierten Ergebnissen nicht größer als $\pm 1,36 \log_{10}$ -Einheiten sein. Es wird also erwartet, dass das Ergebnis eines zweiten Labors zwischen 2,64 ($4,0 - 1,36$) und 5,36 ($4,0 + 1,36$) $\log_{10}$ -Einheiten liegt.

Bei nicht $\log$ -transformierten Ergebnissen sollte das Verhältnis zwischen dem Untersuchungsergebnis des ersten Labors und dem eines zweiten Labors nicht größer als 22,68 sein. Es wird also erwartet, dass das Ergebnis des zweiten Labors zwischen 440 ($= 10\,000/22,68$) und 226 800 ($10\,000 \times 22,68$) KBE je Gramm liegt.

BEISPIEL 2 Ein Labor möchte den höchsten Wert einer Probe ermitteln, der noch einen vorgegebenen Grenzwert einhält (z. B. einen Grenzwert von 1 000 oder $\log_{10} 3$). Dazu muss der R -Wert (auf der logarithmischen Skala) mit einem Faktor von 0,59 multipliziert werden.

Der Faktor 0,59 spiegelt die Tatsache wider, dass eine Untersuchung mit einem einseitigen 95-%-Intervall verwendet wird, um zu prüfen, ob der Grenzwert überschritten wird; er ergibt sich aus der folgenden Gleichung:

$$0,59 = \frac{1,64}{1,96 \times \sqrt{2}}$$

Der höchste Wert beträgt 0,80 ($1,36 \times 0,59$) als Differenz zwischen $\log_{10}$ -transformierten Untersuchungsergebnissen bzw. 6,31 ($10^{0,80}$) als Verhältnis zwischen Untersuchungsergebnissen. Ergebnisse bis zu $\log_{10} 3,80$ ($\log_{10} 3 + \log_{10} 0,80$) bzw. 6 310 ($1\,000 \times 6,31$) zeigen also die Einhaltung des Grenzwertes an.

12 Untersuchungsbericht

Im Untersuchungsbericht muss mindestens Folgendes angegeben werden:

- das angewendete Untersuchungsverfahren mit Verweisung auf dieses Dokument, d. h. ISO 15213-2;
- das angewendete Probenahmeverfahren, sofern bekannt;
- alle in diesem Dokument nicht festgelegten oder als optional oder informativ (einschließlich informativer Anhänge) angesehenen Betriebsbedingungen, einschließlich Einzelheiten zu allen Vorkommnissen, die möglicherweise das (die) Untersuchungsergebnis(se) beeinflusst haben;
- sämtliche Abweichungen von diesem Dokument;
- sämtliche zur vollständigen Identifizierung der Probe notwendigen Angaben;
- das (die) erhaltene(n) Untersuchungsergebnis(se);
- das Untersuchungsdatum;
- falls notwendig oder vom Auftraggeber gefordert, eine Schätzung der Messungenauigkeit eines quantitativen Untersuchungsergebnisses nach ISO 19036:2019, Abschnitt 9.

13 Qualitätssicherung

Das Labor sollte ein Qualitätslenkungssystem haben, um sicherzustellen, dass Geräte, Reagenzien und Techniken für das Verfahren geeignet sind. Die Verwendung von Positivkontrollen, Negativkontrollen und Blindpro-

ben ist Teil des Verfahrens. Die Leistungsprüfung von Nährmedien ist in Anhang B festgelegt und in ISO 11133 beschrieben.

Anhang A (normativ)

Fließschema des Verfahrens

Bild A.1 zeigt die schematische Darstellung des Koloniezählverfahrens für *C. perfringens* in Proben aus den Bereichen Lebensmittel, Futtermittel, Umgebung und Primärproduktion.

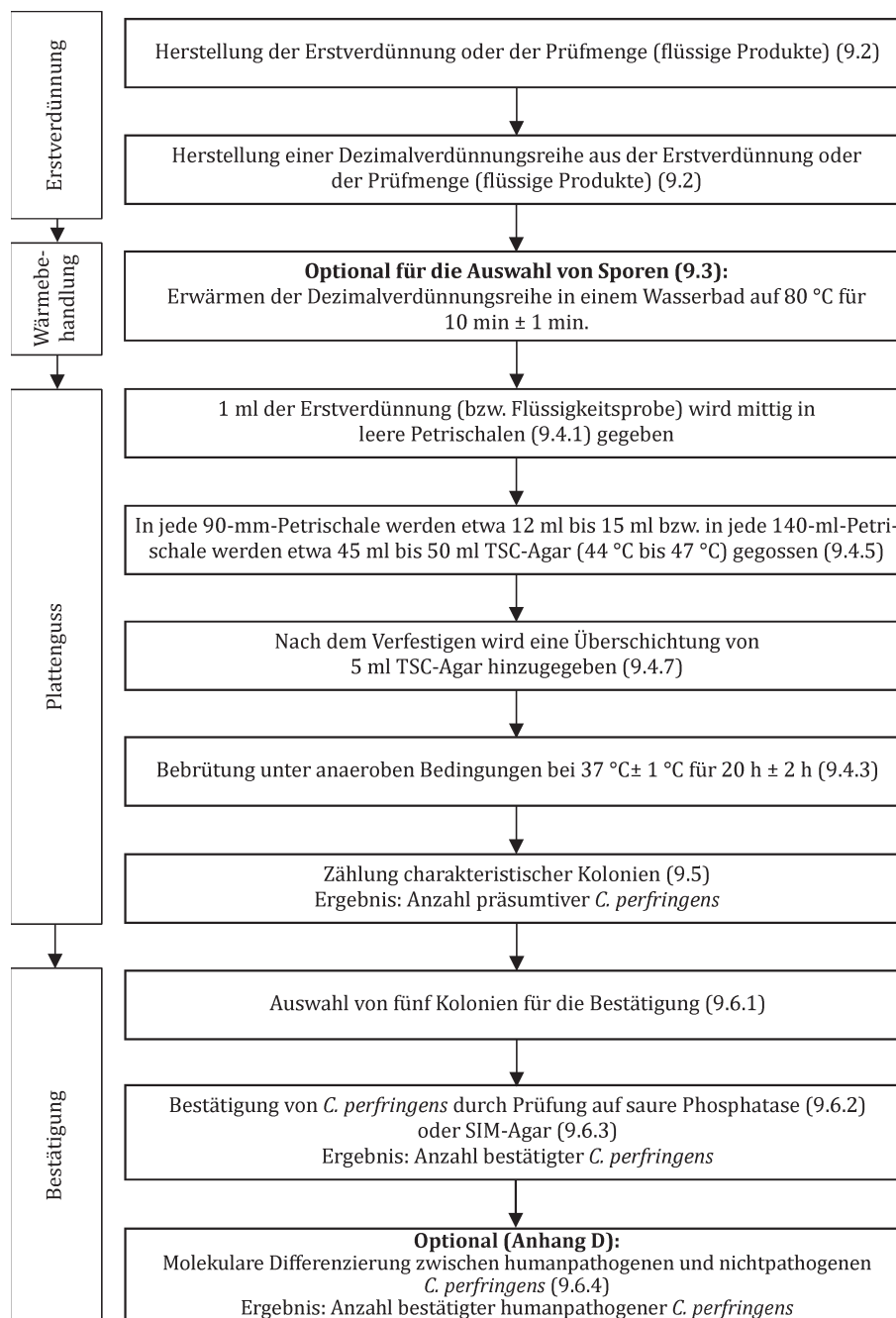


Bild A.1 — Fließschema des Koloniezählverfahrens für *C. perfringens*

Anhang B **(normativ)**

Nährmedien und Reagenzien

B.1 Allgemeines

Die allgemeinen Anforderungen aus ISO 11133 gelten für die Herstellung und Leistungsprüfung der in diesem Anhang beschriebenen Nährmedien. Wenn Nährmedien oder Reagenzien aus dehydrierten Vollmedien/Reagenzien hergestellt werden, oder wenn gebrauchsfertige Medien/Reagenzien verwendet werden, werden die Anweisungen des jeweiligen Herstellers bezüglich der Vorbereitung/Herstellung, der Lagerbedingungen, des Verfallsdatums und der Verwendung befolgt.

Die in diesem Anhang angegebene Haltbarkeitsdauer der Medien wurde in mehreren Studien bestimmt. Der Anwender muss dies unter den Lagerungsbedingungen im eigenen Labor verifizieren (in Übereinstimmung mit ISO 11133).

Die Leistungsprüfung von Nährmedien ist in B.7 beschrieben.

B.2 Tryptose-Sulfit-Cycloserin-Agar (TSC)

B.2.1 Basalmedium

B.2.1.1 Zusammensetzung

Pepton ^a		15,0 g
Soja, enzymatisch verdaut		5,0 g
Hefeextrakt		5,0 g
Natriumdisulfit (Natriummetabisulfit), wasserfrei ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$)	(CAS-Nr. 7681-57-4)	1,0 g
Eisen(III)-Ammoniumcitrat ^b	(CAS-Nr. 1185-57-5)	1,0 g
Agar ^c		9,0 bis 18,0 g
Wasser		1 000 ml

^a Zum Beispiel enzymatisch verdautes Casein.

^b Dieses Reagenz sollte mindestens 15 % (Massenanteil) Eisen enthalten.

^c In Abhängigkeit von den Gelieeigenschaften des Agars.

B.2.1.2 Herstellung

Die Inhaltsstoffe werden in das Wasser gegeben und unter Erhitzung und Rühren gelöst. Es wird 15 min durch Autoklavieren (6.2) bei 121 °C sterilisiert. Es wird auf 45 °C bis 47 °C (6.12) abkühlen gelassen. Das Basalmedium darf bei 5 °C ± 3 °C (6.3) bis zu 4 Wochen in geschlossenen Behältern oder Röhrchen gelagert werden. Um das vollständige Medium herzustellen, wird das gelagerte Medium mit Dampf erneut geschmolzen und vor der Zugabe der Cycloserinlösung (siehe B.2.2) auf 44 °C bis 47 °C (6.12) abgekühlt.

B.2.2 D-Cycloserinlösung

B.2.2.1 Zusammensetzung

D-Cycloserin	(CAS-Nr. 68-41-7)	4,0 g
Wasser		100 ml

B.2.2.2 Herstellung

Das D-Cycloserin wird in Wasser aufgelöst und durch eine Membran mit einer Porengröße von 0,2 µm filtriert. Es wird aseptisch in geeignete Volumina abgefüllt, bei -20 °C (6.5) aufbewahrt und innerhalb von 4 Wochen nach der Herstellung verwendet. Alternativ können die abgegebenen Volumina von Cycloserin maximal 12 Monate bei -70 °C (6.5) aufbewahrt werden.

B.2.3 Vollständiges Medium

B.2.3.1 Zusammensetzung

Basalmedium (B.2.1)		100 ml
D-Cycloserinlösung (B.2.2)		1 ml

B.2.3.2 Herstellung

Unmittelbar vor der Verwendung im Gussplattenverfahren (siehe 9.4.2) wird zu 100 ml sterilem verflüssigtem Medium (B.2.1), das auf 44 °C bis 47 °C (6.12) abgekühlt ist, 1 ml D-Cycloserinlösung (B.2.2) hinzugefügt, um eine Cycloserin-Endkonzentration von 0,4 g je Liter TSC-Agar zu erhalten. Der endgültige pH-Wert des Mediums sollte $7,6 \pm 0,2$ bei 25 °C entsprechen (6.6).

B.3 Columbia-Blutagar (CBA)

B.3.1 Columbia-Blutagar-Grundmedium

B.3.1.1 Zusammensetzung

Tierisches Gewebe, enzymatisch verdaut		23,0 g
Lösliche Stärke	(CAS-Nr. 9005-84-9)	1,0 g
Natriumchlorid	(CAS-Nr. 7647-14-5)	5,0 g
Agar ^a		8,0 bis 18,0 g
Wasser		1 000 ml
^a In Abhängigkeit von den Geliereigenschaften des Agars.		

B.3.1.2 Herstellung

Die Inhaltsstoffe werden, bei Bedarf unter Erhitzung, im Wasser gelöst.

Sofern erforderlich, wird der pH-Wert (6.6) so eingestellt, dass er nach der Sterilisation $7,3 \pm 0,2$ bei 25 °C beträgt.

Das Medium wird in für die Untersuchung geeigneten Anteilen in Kolben (6.8) mit geeignetem Fassungsvermögen verteilt.

Das Medium wird 15 min in einem auf 121 °C eingestellten Autoklaven (6.2) sterilisiert.

B.3.2 Defibriniertes Blut (Pferde- oder Schafsblut)

B.3.3 Vollständiges Grundmedium

B.3.3.1 Zusammensetzung

Grundmedium (B.3.1)	100 ml
Defibriniertes Blut (B.3.2)	5 ml

B.3.3.2 Herstellung

Das Blut wird zum zuvor auf 44 °C bis 47 °C (6.12) abgekühlten Grundmedium gegeben. Es wird gut durchmischt.

Das Medium (B.3.3.1) wird in für die Untersuchung geeigneten Anteilen in sterile Petrischalen (6.11) verteilt. Das Medium wird zum Festwerden stehen gelassen.

Direkt vor der Verwendung werden die Agarplatten nach dem in ISO 11133 festgelegten Verfahren getrocknet.

Die gegossenen Platten werden bei 5 °C ± 3 °C (6.7) bis zu 4 Wochen vor Austrocknung geschützt gelagert.

B.4 Reagenz für saure Phosphatase

B.4.1 Zusammensetzung

1-Naphthylphosphat-Dinatriumsalz	(CAS-Nr. 2183-17-7)	0,4 g
Echtblausalz B (o-Dianisidin-bis(diazotiert) Zink-Doppelsalz)	(CAS-Nr. 14263-94-6)	0,8 g
Acetatpuffer (pH 4,6 ± 0,2)		20 ml

B.4.2 Herstellung

Der Acetatpuffer wird durch Auflösen von 0,3 ml Eisessig (CAS-Nr. 64-19-7) und 0,4 g Natriumacetat (CAS-Nr. 127-09-3) in deionisiertem Wasser hergestellt und auf 1 000 ml aufgefüllt. Alternativ wird ein im Handel erhältliches Produkt verwendet. Die Zutaten werden im Acetatpuffer aufgelöst und 60 min ± 5 min bei 5 °C ± 3 °C (6.7) stehen gelassen, um Ausfällung zu ermöglichen. Dann wird die Lösung mit einem Faltenfilter filtriert, um den Niederschlag zu entfernen. Die hergestellte Lösung wird bei 5 °C ± 3 °C (6.7) für nicht länger als zwei Wochen gelagert. Bei erneuter Ausfällung wird vor der Verwendung noch einmal gefiltert.

Anstelle von 1-Naphthylphosphat-Dinatriumsalz darf 1-Naphthylphosphat-Mononatriumsalz (CAS-Nr. 81012-89-7) verwendet werden.

ANMERKUNG Die Zusammensetzung und Herstellung der sauren Phosphatase entspricht ISO 14189 (Literaturhinweise[3]), unterscheidet sich jedoch von der ursprünglichen Beschreibung in der Literatur.

WARNHINWEIS — Echtblausalz B ist giftig und möglicherweise krebserregend; beim Auswägen, Herstellen und Entsorgen des Reagenz müssen entsprechende Vorkehrungen getroffen werden.

B.5 SIM-Agar-Röhrchen

B.5.1 Zusammensetzung

Pepton ^a		6,0 g
Soja, enzymatisch verdaut		20 g
Eisenhaltiges Ammoniumsulfat (wasserfrei) (FeH ₈ N ₂ O ₈ S ₂)	(CAS-Nr. 10045-89-3)	0,2 g
Natriumthiosulfat (Na ₂ O ₃ S ₂)	(CAS-Nr. 7772-98-7)	0,2 g
Agar		8,0 bis 18 g
Wasser		1 000 ml
^a Zum Beispiel enzymatisch verdautes Casein.		

B.5.2 Herstellung

Die Inhaltsstoffe werden, bei Bedarf unter Erhitzung, im Wasser gelöst. 10 ml werden in Röhrchen gefüllt und 15 min im auf 121 °C eingestellten Autoklaven sterilisiert.

B.6 Kovacs-Reagenzien

B.6.1 Zusammensetzung

4-(Methylamino)benzaldehyd (C ₈ H ₉ NO) (CAS-Nr. 556-21-8)	5,0 g
Salzsäure, ρ – 1,18 g/ml bis 1,19 g/ml	25 ml
2-Methyl-2-butanol (C ₅ H ₁₂ O) (CAS-Nr. 75-85-4)	75 ml

B.6.2 Herstellung

Die Bestandteile werden gemischt und das Reagenz in einem geschlossenen Kolben im Dunkeln bei 5 °C ± 3 °C bis zu sechs Monate gelagert.

B.7 Leistungsprüfung

Zur Definition von Selektivität und Produktivität siehe ISO 11133. Im Allgemeinen werden die in ISO 11133 beschriebenen Verfahren zur Leistungsprüfung befolgt.

Für den Bestätigungsschritt, der durch Prüfung auf saure Phosphatase oder SIM-Agar durchgeführt wird, werden bekannte positive und negative Kontrollstämme einbezogen. Mindestens einer der in Tabelle B.1 aufgeführten *C. perfringens*-Stämme muss als Positivkontrolle für die Bestätigungsprüfung verwendet werden.

Tabelle B.1 — Leistungsprüfung zur Qualitätssicherung der Nährmedien

Medium	Funktion	Bebrütung	Kontrollstämme	WDCM-Nummern ^a	Kontrollverfahren	Kriterien ^{c,d}
TSC	Produktivität	(20 ± 2) h/ (37 ± 1) °C anaerobes Klima	<i>Clostridium perfringens</i>	00007 ^b 00080 00174	quantitativ	$P_R \geq 0,5$, schwarze Kolonien
	Selektivität		<i>Bacillus subtilis</i>	00003	qualitativ	vollständige Hemmung (0)

- Entwurf -

E DIN EN ISO 15213-2:2022-10
prEN ISO 15213-2:2022 (D)

Tabelle B.1 (fortgesetzt)

Medium	Funktion	Bebrütung	Kontrollstämme	WDCM-Nummern ^a	Kontrollverfahren	Kriterien ^{c,d}
CBA	Produktivität	(20 ± 2) h/ (37 ± 1) °C anaerobes Klima	<i>Clostridium perfringens</i>	00007 ^b	qualitativ	gutes Wachstum (2), Kolonien mit beta-Hämolyse
saure Phosphatase	Bestätigung/ Identifizierung	3 min	<i>Clostridium perfringens</i>	00007 ^b 00080 00174	qualitativ	violette Farbe
		4 min	<i>Bacillus subtilis</i>	00003	qualitativ	keine Farbänderung
SIM-Agar in Kombination mit Kovacs-Reagenzien	Bestätigung/ Identifizierung	22 h ± 2 h bei 37 °C ± 1 °C anaerobes Klima	<i>Clostridium perfringens</i>	00007 ^b 00080 00174	qualitativ	gutes Wachstum (2), Schwärzung des Röhrchens, kein Wachstum außerhalb des Beimpfungseinstichs und kein rot gefärbter Ring nach dem Hinzufügen von Kovacs-Reagenzien
			<i>Escherichia coli</i>	00012 oder 00013 ^b	qualitativ	gutes Wachstum (2), keine Schwärzung der Röhrchen, mögliches Wachstum außerhalb des Beimpfungseinstichs und rot gefärbter Ring nach dem Hinzufügen von Kovacs-Reagenzien

^a Siehe Referenzstamm-Katalog unter <http://www.wfcc.info> für Informationen zu Stammnummern aus Kulturensammlungen und Kontaktdaten; WDCM: World Data Centre for Microorganisms.

^b Stamm, der mindestens zu verwenden ist.

^c P_R = Produktivitätsverhältnis (en: productivity ratio).

^d Das Wachstum wird kategorisiert als 0: kein Wachstum; 1: schwaches Wachstum (teilweise Hemmung); 2: gutes Wachstum (siehe ISO 11133).

**Anhang C
(informativ)**

Verfahrensvalidierungsstudien und Leistungsmerkmale

Das staatliche niederländische Institut für Volksgesundheit (RIVM) organisierte im Januar 2000 einen Ringversuch (siehe [14], [20]) zur Validierung von ISO 7937, an der 17 Laboratorien in 15 Ländern beteiligt waren und in dem Käse, Fleisch, Trockenfutter und ein Referenzmaterial untersucht wurden. Die Lebens-/Futtermittelproben wurden jeweils mit drei verschiedenen Kontaminationsgraden mit *C. perfringens* untersucht. Aufgrund der veränderten Zusammensetzung von TSC-Agar wurde für ISO 15213-2 in den Jahren 2019 und 2021 ein neuer Ringversuch in zwei Teilen durchgeführt.

Im ersten Teil des Ringversuchs, an dem 11 Laboratorien in 5 Ländern beteiligt waren, wurden Fertigsuppe, Ananas in Dosen, Umweltabstriche und Futtersilage untersucht. Die (Lebensmittel-)Proben wurden jeweils mit geringem, mittlerem und hohem Kontaminationsgrad untersucht. Der Versuch wurde 2019 von Merck, FrieslandCampina und dem Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit organisiert.

Im zweiten Teil des Ringversuchs, an dem 10 Laboratorien in 5 Ländern beteiligt waren, wurden Fisch und Fleisch in Dosen sowie Säuglingsnahrung in Pulverform untersucht. Die Lebensmittelproben wurden jeweils mit geringem, mittlerem und hohem Kontaminationsgrad untersucht. Der Versuch wurde 2019 von Merck, FrieslandCampina und dem Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit organisiert.

Das Verfahren, das beiden Teilen des Ringversuchs zugrunde gelegt wurde, war das in diesem Dokument beschriebene.

Die in Tabelle C.1 bis Tabelle C.7 aufgeführten Werte der Leistungsmerkmale jeder (Lebensmittel-)Einheit und jeder Kategorie, die aus diesem Ringversuch abgeleitet wurde, wurden nach ISO 16140-2 berechnet.

**Tabelle C.1 — Ergebnisse der Datenanalyse von Fertigsuppe [Kategorie:
Mehrkomponenten-Lebensmittel bzw. Mahlzeitkomponenten]**

Parameter	Geringe Konta- mination	Mittlere Kontamination	Hohe Kontamination
Anzahl teilnehmender Labore	11	11	11
Anzahl der Labore, mit denen die Zusammenarbeit nach der Auswertung der Daten fortgeführt wurde	11	11	11
Anzahl der Proben	22	22	22
Anzahl der Probenergebnisse, die nach der Auswertung der Daten beibehalten wurden	22	22	22
Mittelwert Σa ($\log_{10}$ KBE/g)	0,647	0,683	0,718
Wiederholstandardabweichung s_r ($\log_{10}$ KBE/g)	0,208	0,080	0,070
Wiederholgrenze r :			
als Unterschied auf $\log_{10}$ -Skala ($\log_{10}$ KBE/g)	0,583	0,224	0,197
als Verhältnis auf üblicher Skala (KBE/g)	3,832	1,676	1,573
Vergleichstandardabweichung s_R ($\log_{10}$ KBE/g)	0,621	0,654	0,688
Vergleichgrenze R :			
als Unterschied auf $\log_{10}$ -Skala ($\log_{10}$ KBE/g)	1,738	1,831	1,925
als Verhältnis auf üblicher Skala (KBE/g)	54,718	67,814	84,184

Tabelle C.2 — Ergebnisse der Datenanalyse von Ananas in Dosen [Kategorie: verarbeitetes Obst und Gemüse]

Parameter	Geringe Kontamination	Mittlere Kontamination	Hohe Kontamination
Anzahl teilnehmender Labore	11	11	11
Anzahl der Labore, mit denen die Zusammenarbeit nach der Auswertung der Daten fortgeführt wurde	9	10	11
Anzahl der Proben	18	20	22
Anzahl der Probenergebnisse, die nach der Auswertung der Daten beibehalten wurden	18	20	22
Mittelwert Σa ($\log_{10}$ KBE/g)	0,477	0,668	0,832
Wiederholstandardabweichung s_r ($\log_{10}$ KBE/g)	0,091	0,070	0,061
Wiederholgrenze r :			
als Unterschied auf $\log_{10}$ -Skala ($\log_{10}$ KBE/g)	0,254	0,197	0,171
als Verhältnis auf üblicher Skala (KBE/g)	1,795	1,573	1,481
Vergleichstandardabweichung s_R ($\log_{10}$ KBE/g)	0,453	0,637	0,797
Vergleichgrenze R :			
als Unterschied auf $\log_{10}$ -Skala ($\log_{10}$ KBE/g)	1,269	1,784	2,231
als Verhältnis auf üblicher Skala (KBE/g)	18,599	60,771	170,223

Tabelle C.3 — Ergebnisse der Datenanalyse von Umweltaustrichen [Kategorie: Umgebungsproben (Lebensmittel- oder Futtermittelproduktion)]

Parameter	Geringe Kontamination	Mittlere Kontamination	Hohe Kontamination
Anzahl teilnehmender Labore	10	10	11
Anzahl der Labore, mit denen die Zusammenarbeit nach der Auswertung der Daten fortgeführt wurde	10	10	11
Anzahl der Proben	20	20	22
Anzahl der Probenergebnisse, die nach der Auswertung der Daten beibehalten wurden	20	20	22
Mittelwert Σa ($\log_{10}$ KBE/g)	0,477	0,498	0,657
Wiederholstandardabweichung s_r ($\log_{10}$ KBE/g)	0,160	0,117	0,065
Wiederholgrenze r :			
als Unterschied auf $\log_{10}$ -Skala ($\log_{10}$ KBE/g)	0,449	0,327	0,182
als Verhältnis auf üblicher Skala (KBE/g)	2,813	2,122	1,519
Vergleichstandardabweichung s_R ($\log_{10}$ KBE/g)	0,457	0,475	0,629
Vergleichgrenze R :			
als Unterschied auf $\log_{10}$ -Skala ($\log_{10}$ KBE/g)	1,278	1,331	1,760
als Verhältnis auf üblicher Skala (KBE/g)	18,983	21,414	57,604

Tabelle C.4 — Ergebnisse der Datenanalyse von Futtersilage [Kategorie: (Heim-)Tierfuttermittel]

Parameter	Geringe Kontamination	Mittlere Kontamination	Hohe Kontamination
Anzahl teilnehmender Labore	8	8	10
Anzahl der Labore, mit denen die Zusammenarbeit nach der Auswertung der Daten fortgeführt wurde	8	8	10
Anzahl der Proben	16	16	20
Anzahl der Probenergebnisse, die nach der Auswertung der Daten beibehalten wurden	16	16	20
Mittelwert Σa ($\log_{10}$ KBE/g)	0,662	0,642	0,831
Wiederholstandardabweichung s_r ($\log_{10}$ KBE/g)	0,227	0,098	0,134
Wiederholgrenze r :			
als Unterschied auf $\log_{10}$ -Skala ($\log_{10}$ KBE/g)	0,637	0,276	0,376
als Verhältnis auf üblicher Skala (KBE/g)	4,332	1,886	2,375
Vergleichstandardabweichung s_R ($\log_{10}$ KBE/g)	0,626	0,606	0,793
Vergleichgrenze R :			
als Unterschied auf $\log_{10}$ -Skala ($\log_{10}$ KBE/g)	1,754	1,696	2,219
als Verhältnis auf üblicher Skala (KBE/g)	56,730	49,688	165,656

Tabelle C.5 — Ergebnisse der Datenanalyse von Fisch in Dosen [Kategorie: verzehrfertige, aufwärmfertige Fischereiprodukte]

Parameter	Geringe Kontamination	Mittlere Kontamination	Hohe Kontamination
Anzahl teilnehmender Labore	9	9	9
Anzahl der Labore, mit denen die Zusammenarbeit nach der Auswertung der Daten fortgeführt wurde	9	9	9
Anzahl der Proben	18	18	18
Anzahl der Probenergebnisse, die nach der Auswertung der Daten beibehalten wurden	18	18	18
Mittelwert Σa ($\log_{10}$ KBE/g)	0,226	0,429	0,566
Wiederholstandardabweichung s_r ($\log_{10}$ KBE/g)	0,204	0,193	0,035
Wiederholgrenze r :			
als Unterschied auf $\log_{10}$ -Skala ($\log_{10}$ KBE/g)	0,571	0,540	0,097
als Verhältnis auf üblicher Skala (KBE/g)	3,725	3,465	1,251
Vergleichstandardabweichung s_R ($\log_{10}$ KBE/g)	0,356	0,543	0,309
Vergleichgrenze R :			
als Unterschied auf $\log_{10}$ -Skala ($\log_{10}$ KBE/g)	0,997	1,522	0,864
als Verhältnis auf üblicher Skala (KBE/g)	9,936	33,234	7,317