

2024

Mikrobiologie potravinového řetězce – Horizontální metoda průkazu a stanovení počtu bakterií rodu *Clostridium* –
Část 2: Stanovení počtu *Clostridium perfringens* technikou počítání kolonií

ČSN
EN ISO 15213-2
56 0652

idt 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

Microbiologie de la chaîne alimentaire – Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de *Clostridium* spp. –

Partie 2: Dénombrement des *Clostridium perfringens* par la technique de comptage des colonies

Mikrobiologie der Nahrungskette – Horizontales Verfahren zum Nachweis und zur Aufzählung von *Clostridium* spp. –

Teil 2: Zählung von *Clostridium perfringens* durch Koloniezählverfahren

Tato norma je českou verzí evropské normy EN ISO 15213-2:2023. Překlad byl zajištěn Českou agenturou pro standardizaci. Má stejný status jako oficiální verze.

This standard is the Czech version of the European Standard EN ISO 15213-2:2023. It was translated by the Czech Standardization Agency. It has the same status as the official version.

Nahrazení předchozích norem

Touto normou se nahrazuje ČSN EN ISO 7937 (56 0091) z února 2006.

Národní předmluva

Změny proti předchozí normě

Hlavní změny proti předchozí normě jsou uvedeny v předmluvě.

Informace o citovaných dokumentech

ISO 6887 (soubor) zaveden v ČSN EN ISO 6887 (soubor) (56 0102) Mikrobiologie potravinového řetězce – Příprava analytických vzorků, výchozí suspenze a desetinasobných ředění pro mikrobiologické zkoušení

ISO 7218 zavedena v ČSN EN ISO 7218 (56 0103) Mikrobiologie potravin a krmiv – Všeobecné požadavky a doporučení pro mikrobiologické zkoušení

ISO 11133 zavedena v ČSN EN ISO 11133 (56 0099) Mikrobiologie potravin, krmiv a vody - Příprava, výroba, uchovávání a zkoušení výkonnosti kultivačních půd

ISO 19036:2019 zavedena v ČSN EN ISO 19036:2020 (56 0625) Mikrobiologie potravinového řetězce - Odhad nejistoty měření při kvantitativním stanovení

Souvisící ČSN

ČSN EN ISO 707 (57 0003) Mléko a mléčné výrobky - Návod pro odběr vzorků

ČSN EN ISO 13307 (56 0101) Mikrobiologie potravin a krmiv - Prvovýroba - Techniky odběru vzorků

ČSN EN ISO 14189 (75 7865) Kvalita vod - Stanovení *Clostridium perfringens* - Metoda membránových filtrů

ČSN EN ISO 15213-1 (56 0652) Mikrobiologie potravinového řetězce - Horizontální metoda stanovení průkazu a stanovení počtu bakterií rodu *Clostridium* - Část 1: Stanovení počtu bakterií rodu *Clostridium* redukujících siřičitany technikou počítání kolonií

ČSN EN ISO 16140-2 (56 0078) Mikrobiologie potravinového řetězce - Validace metody - Část 2: Protokol pro validaci alternativních (vlastních - autorských) metod ve srovnání s referenční metodou

ČSN EN ISO 16140-4 (56 0078) Mikrobiologie potravinového řetězce - Validace metody - Část 4: Protokol pro vnitrolaboratorní validaci metody

ČSN EN ISO 16140-6 (56 0078) Mikrobiologie potravinového řetězce - Validace metody - Část 6: Protokol pro validaci alternativních (chráněných) metod pro mikrobiologickou konfirmaci a typizačních postupů

ČSN EN ISO 17468 (56 0104) Mikrobiologie potravinového řetězce - Technické požadavky a návod pro zavedení nebo revizi normalizované referenční metody

ČSN EN ISO 17604 (56 0105) Mikrobiologie potravinového řetězce - Vzorkování těl poražených zvířat pro mikrobiologické vyšetření

ČSN P CEN ISO/TS 17728 (56 0100) Mikrobiologie potravinového řetězce - Techniky odběru vzorků pro mikrobiologické zkoušení potravin a krmiv

ČSN EN ISO 18593 (56 0626) Mikrobiologie potravinového řetězce - Horizontální metody specifikující techniky vzorkování z povrchů

ČSN EN ISO 19036 (56 0625) Mikrobiologie potravinového řetězce - Odhad nejistoty měření při kvantitativním stanovení

ČSN EN ISO 22118 (56 0653) Mikrobiologie potravin a krmiv - Polymerázová řetězová reakce (PCR) k průkazu a kvantifikaci mikroorganismů působících onemocnění z potravin - Charakteristiky metody

ČSN EN ISO 22119 (56 0654) Mikrobiologie potravin a krmiv - Polymerázová řetězová reakce (PCR) k průkazu a kvantifikaci mikroorganismů působících onemocnění z potravin - Všeobecné požadavky a definice

ČSN EN ISO 22174 (50 0012) Mikrobiologie potravin a krmiv - Polymerázová řetězová reakce (PCR)

k průkazu a kvantifikaci mikroorganismů působících onemocnění z potravin – Všeobecná ustanovení a definice

Upozornění na národní poznámky

Do normy byly k článkům B.2.1.1, D.2.2.4.1, D.3.2.6 a tabulkám D.5 a D.17 doplněny národní poznámky.

Vypracování normy

Zpracovatel odborného překladu: QUALIMENT Praha, komise České potravinářské společnosti, z.s.,
IČO 539525, MVDr. Tomáš Brychta

Technická normalizační komise: TNK 151 Potraviny

Vydala: Česká agentura pro standardizaci, státní příspěvková organizace

Citované dokumenty a souvisící ČSN lze získat na e-shopu.

Česká agentura pro standardizaci je státní příspěvková organizace zřízená Úřadem pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví na základě ustanovení § 5 odst. 2 zákona č. 22/1997 Sb., o technických požadavcích na výrobky a o změně a doplnění některých zákonů, ve znění pozdějších předpisů.

ICS 07.100.30
7937:2004

Nahrazuje EN ISO

Mikrobiologie potravinového řetězce – Horizontální metoda průkazu
a stanovení počtu bakterií rodu *Clostridium* –

Část 2: Stanovení počtu *Clostridium perfringens* technikou počítání kolonií
(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 des *Clostridium*
perfringens
par la technique de comptage des colonies
(ISO 15213-2:2023)

Mikrobiologie der Nahrungskette – Horizontales
Verfahren zum Nachweis und zur Aufzählung
von *Clostridium* spp. –
Teil 2: Zählung von *Clostridium perfringens*
durch Koloniezählverfahren
(ISO 15213-2:2023)

Tato evropská norma byla schválena CEN dne 2023-09-12.

Členové CEN jsou povinni splnit vnitřní předpisy CEN/CENELEC, v nichž jsou stanoveny podmínky,
za kterých se této evropské normě bez jakýchkoliv modifikací uděluje status národní normy.

Aktualizované seznamy a biblio-

grafické citace týkající se těchto národních norem lze obdržet na vyžádání v Řídicím centru CEN-
CENELEC nebo u kteréhokoli člena CEN.

Tato evropská norma existuje ve třech oficiálních verzích (anglické, francouzské, německé). Verze
v každém jiném jazyce přeložená členem CEN do jeho vlastního jazyka, za kterou zodpovídá a kterou
notifikuje Řídicímu centru CEN-CENELEC, má stejný status jako oficiální verze.

Členy CEN jsou národní normalizační orgány Belgie, Bulharska, České republiky, Dánska, Estonska,
Finska, Francie, Chorvatska, Irska, Islandu, Itálie, Kypru, Litvy, Lotyšska, Lucemburska, Maďarska,
Malty, Německa,

Nizozemska, Norska, Polska, Portugalska, Rakouska, Republiky Severní Makedonie, Rumunska, Řecka,
Slovenska, Slovinska, Spojeného království, Srbska, Španělska, Švédsko, Švýcarsko a Turecko.



Evropský výbor pro normalizaci
European Committee for Standardization
Comité Européen de Normalisation
Europäisches Komitee für Normung

Řídicí centrum CEN-CENELEC: Rue de la Science 23, B-1040 Brusel

© 2023 CEN Veškerá práva pro využití v jakémkoliv formě a jakýmkoliv prostředky
jsou celosvětově vyhrazena národním členům CEN.

Ref. č. EN ISO 15213-2:2023 E

Evropská předmluva

Tento dokument (EN ISO 15213-2:2023) vypracovala technická komise ISO/TC 34 *Potravinářské výrobky* ve spolupráci s technickou komisí CEN/TC 463 *Mikrobiologie potravinového řetězce*, jejíž sekretariát zajišťuje AFNOR.

Této evropské normě je nutno nejpozději do května 2024 udělit status národní normy, a to buď vydáním identického textu, nebo schválením k přímému používání, a národní normy, které jsou s ní v rozporu, je nutno zrušit nejpozději do května 2024.

Upozorňuje se na možnost, že některé prvky tohoto dokumentu mohou být předmětem patentových práv. CEN nelze činit odpovědným za identifikaci jakéhokoli nebo všech patentových práv.

Tento dokument nahrazuje EN ISO 7937:2004.

Tento dokument byl vypracován na základě normalizačního požadavku adresovaného CEN Evropskou komisí a Evropským sdružením volného obchodu.

Jakákoli zpětná vazba a otázky týkající se tohoto dokumentu mají být adresovány národnímu normalizačnímu orgánu uživatele. Úplný seznam těchto orgánů lze nalézt na webových stránkách CEN.

Podle vnitřních předpisů CEN-CENELEC jsou tuto evropskou normu povinny zavést národní normalizační organizace následujících zemí: Belgie, Bulharska, České republiky, Dánska, Estonska, Finska, Francie, Chorvatska, Irska, Islandu, Itálie, Kypru, Litvy, Lotyšska, Lucemburska, Maďarska, Malty, Německa, Nizozemska, Norska, Polska, Portugalska, Rakouska, Republiky Severní Makedonie, Rumunska, Řecka, Slovenska, Slovinska, Spojeného království, Srbska, Španělska, Švédsko, Švýcarsko a Turecko.

Oznámení o schválení

Text ISO 15213-2:2023 byl schválen CEN jako EN ISO 15213-2:2023 bez jakýchkoli modifikací.

Předmluva.....	
.....	8
Úvod.....	
.....	9
1..... Předmět normy.....	10
2..... Citované dokumenty.....	10
3..... Termíny a definice.....	11
4..... Podstata zkoušky.....	11
4.1..... Obecně.....	11
4.2..... Příprava ředění.....	12
4.3..... Stanovení počtu.....	12
4.4..... Konfirmace.....	12
5..... Kultivační půdy a činidla.....	12
6..... Vybavení a spotřební materiály.....	12
7..... Vzorkování.....	13

8.....	Příprava zkušebního vzorku.....	.. 13
9.....	Postup zkoušky.....	13
9.1.....	Obecně.....	13
9.2.....	Zkušební podíl, výchozí suspenze a ředění.....	13
9.3.....	Tepelné ošetření pro výběr spor.....	13
9.4.....	Inokulace a inkubace.....	13
9.5.....	Stanovení počtu typických kolonií.....	14
9.6.....	Konfirmace <i>C. perfringens</i>	14
9.6.1...	Výběr kolonií pro konfirmaci.....	14
9.6.2...	Zkouška kyselé fosfatázy.....	15
9.6.3...	Zkouška pohyblivosti na půdě se siřičitanem a indolem (SIM).....	15
9.6.4...	Rozlišení mezi kmeny <i>C. perfringens</i> pro člověka patogenními a nepatogenními (volitelné).....	15
9.6.5...	Interpretace.....	15
10.....	Vyjádření výsledků.....	15
11.....	Validace metody.....	

.....	16
11.1.... Mezilaboratorní studie.....	16
11.2.... Výkonnostní charakteristiky.....	16
12..... Protokol o zkoušce.....	17
13..... Zajištění kvality.....	17
Příloha A (normativní) Vývojový diagram postupu.....	18
Příloha B (normativní) Kultivační půdy a činidla.....	20
Příloha C (informativní) Validační studie a výkonnostní charakteristiky metody.....	24
Příloha D (informativní) Molekulární rozlišení mezi patogenními a nepatogenními <i>C. perfringens</i>	27
Bibliografie.....	45

Předmluva

ISO (Mezinárodní organizace pro normalizaci) je celosvětová federace národních normalizačních orgánů (členů ISO). Mezinárodní normy obvykle vypracovávají technické komise ISO. Každý člen ISO, který se zajímá o předmět, pro který byla vytvořena technická komise, má právo být v této technické komisi zastoupen. Práce se zúčastňují také vládní i nevládní mezinárodní organizace, s nimiž ISO navázala pracovní styk. ISO úzce spolupracuje s Mezinárodní elektrotechnickou komisí (IEC) ve všech záležitostech normalizace v elektrotechnice.

Postupy použité při tvorbě tohoto dokumentu a postupy určené pro jeho další udržování jsou popsány ve směrnících ISO/IEC, část 1. Zejména se má věnovat pozornost rozdílným schvalovacím kritériím potřebným pro různé druhy dokumentů ISO. Tento dokument byl vypracován v souladu s redakčními pravidly uvedenými ve směrnících ISO/IEC, část 2 (viz www.iso.org/directives).

ISO upozorňuje na možnost, že implementace tohoto dokumentu smí vyžadovat využití patentu (patentů). V souvislosti s tím ISO nezaujímá žádné stanovisko týkající se důkazů, platnosti nebo použitelnosti všech uplatňovaných patentových práv. Ke dni zveřejnění tohoto dokumentu ISO neobdržela oznámení o patentu (patentech), který smí být vyžadován pro implementaci tohoto dokumentu. ISO však upozorňuje implementující organizace, že se nemusí jednat o nejnovější informace, které lze získat z databáze patentů dostupné na adrese www.iso.org/patents. ISO nelze činit odpovědnou za identifikaci všech takových patentových práv. Jakýkoliv obchodní název použitý v tomto dokumentu se uvádí jako informace pro usnadnění práce uživatelů a neznamena schválení.

Vysvětlení nezávazného charakteru technických norem, významu specifických termínů a výrazů ISO, které se vztahují k posuzování shody, jakož i informace o tom, jak ISO dodržuje principy Světové obchodní organizace (WTO) týkající se technických překážek obchodu (TBT), jsou uvedeny na tomto odkazu URL: www.iso.org/iso/foreword.html.

Tento dokument vypracovala technická komise ISO/TC 34 *Potravinářské výroby*, subkomise SC 9 *Mikrobiologie* ve spolupráci s technickou komisí Evropské komise pro normalizaci (CEN) CEN/TC 463 *Mikrobiologie potravinového řetězce* na základě Dohody o technické spolupráci mezi ISO a CEN (Vídeňská dohoda).

Toto první vydání ISO 15213-2 zrušuje a nahrazuje ISO 7937:2004, které bylo technicky zrevidováno.

Hlavní změny jsou následující:

- předmět normy byl rozšířen, aby zahrnoval vzorky z prvovýroby;
- tepelné ošetření 10 min při 80 °C bylo učiněno volitelné v případě většího výskytu doprovodné mikroflóry nebo pro stanovení počtu pouze spor *Clostridium (C.) perfringens* přítomných ve vzorku;
- selektivní půda byla přejmenována z agaru se siřičitanem a cykloserinem (SC) na agar s tryptózou, siřičitanem a cykloserinem (TSC) beze změn ve složení;
- popsané konfirmační metody byly upraveny podle ISO 14189;
- vývojový diagram v normativní příloze A, který uvádí krátký popis postupu, byl zrevidován;
- v příloze B byla přidána kritéria pro zkoušení výkonnosti kultivačních půd;

- v příloze C (informativní) byly přidány výkonnostní charakteristiky;
- v příloze D (informativní), byly přidány dvě molekulární metody pro rozlišení mezi patogenním a nepatogenním *C. perfringens* a jedna molekulární metoda pro rozlišení kmenů *C. perfringens* typu A nesoucích *cpe* gen na chromozomu nebo nesoucích *cpe* gen na plazmidu.

Seznam všech částí souboru ISO 15213 lze nalézt na webových stránkách ISO.

Jakákoli zpětná vazba nebo otázky týkající se tohoto dokumentu mají být adresovány národnímu normalizačnímu orgánu uživatele. Úplný seznam těchto orgánů lze nalézt na adrese www.iso.org/members.html.

Úvod

Clostridium (C.) perfringens je grampozitivní, anaerobní, sporulující bakterie. Jako běžně se vyskytující bakterie se *C. perfringens* nachází především v půdě, ale také ve střevním traktu lidí a zvířat. Proto může být výskyt vysokých počtů *C. perfringens* indikátorem nesprávného zacházení a přípravy potravin.

Vysoké počty *C. perfringens* v potravinách určených k přímé spotřebě mohou způsobovat onemocnění člověka, převážně průjem. Kmeny jsou klasifikovány do skupin podle typu toxinu v závislosti na schopnosti tvořit tzv. „hlavní“ a „vedlejší“ toxiny. Otravy z potravy jsou způsobovány izoláty *C. perfringens* se schopností tvořit enterotoxin (CPE).

Charakteristickým rysem je termorezistence spor; mají schopnost germinovat a množit se v potravině určené k přímé spotřebě po uvaření. Po požití kontaminované potravy následuje gastrointestinální onemocnění, kdy se enterotoxiny *C. perfringens*, které jsou odolné vůči působení enzymů, uvolňují během sporulace v tenkém střevě. Kmeny jsou řazené do různých typů.

Tento dokument popisuje horizontální metodu pro stanovení počtu *C. perfringens* v potravinách, krmivech, vzorcích z prostředí a vzorcích z prvovýroby. Metoda pro stanovení počtu siričitanu redukujících bakterií rodu *Clostridium* je popsána v ISO 15213-1. Metoda detekce *C. perfringens* je popsána v ISO/TS 15213-3. Tyto tři části jsou publikovány jako jeden soubor mezinárodních norem, protože tyto metody spolu úzce souvisí. Obvykle jsou tyto metody v laboratoři prováděny současně a půdy a jejich výkonnostní charakteristiky mohou být podobné.

Hlavní technické změny jmenované v předmluvě, zavedené tímto dokumentem, jsou považovány ve srovnání s ISO 7937:2004 za významné (viz ISO 17468).

Tyto změny mají významný dopad na výkonnostní charakteristiky metody.

UPOZORNĚNÍ - Pro zajištění ochrany zdraví laboratorních pracovníků je nezbytné, aby zkoušky pro stanovení počtu *C. perfringens* byly prováděny pouze ve vhodně vybavených laboratořích pod dohledem zkušeného mikrobiologa a byla věnována velká péče likvidaci všech inkubovaných materiálů. Osoby, které používají tento dokument, mají být obeznámeny se zásadami správné laboratorní praxe. Tento dokument adresně neupozorňuje na všechny bezpečnostní aspekty, pokud existují, spojené s jeho používáním. Je odpovědností uživatele tohoto dokumentu, aby stanovil příslušné postupy v oblasti bezpečnosti a ochrany zdraví.

1 Předmět normy

Tento dokument specifikuje stanovení počtu *Clostridium (C.) perfringens* technikou počítání kolonií.

Tento dokument je použitelný pro:

- výrobky určené pro lidskou spotřebu;
- výrobky určené ke krmení zvířat;
- vzorky prostředí v místech výroby potravin a krmiv, a zacházení s nimi;
- vzorky z prvovýroby.

POZNÁMKA Tato metoda byla validována v mezilaboratorní studii pro následující kategorie potravin:

- masné výrobky k přímé spotřebě, k ohřátí;
- vejce a vaječné výrobky (pocházející z vajec);
- zpracované ovoce a zelenina;
- kojenecká výživa a obiloviny pro kojence;
- vícesložkové potraviny nebo složky pokrmů.

Také byla validována pro následující další kategorie:

- krmivo pro zvířata v zájmovém chovu (pet food) a krmivo pro zvířata;
- vzorky prostředí (výroba potravin nebo krmiv).

Vzhledem k tomu, že tato metoda byla validována pro alespoň pět kategorií potravin, je tato metoda použitelná pro široké spektrum potravin. Detailní informace o validaci viz kapitola 11 a příloha C. Jelikož metoda není běžně používána pro vzorky z prvovýroby, nebyla tato kategorie zahrnuta v mezilaboratorní studii. Proto nebyly pro tuto kategorii získány žádné výkonnostní charakteristiky.

Tato horizontální metoda byla původně vyvinuta pro všechny vzorky, které pocházejí z potravinového řetězce. Na základě informací dostupných v době publikace tohoto dokumentu je tato metoda považována za zcela vhodnou pro vyšetřování veškerých vzorků pocházejících z potravinového řetězce. Vzhledem k velké variabilitě výrobků v potravinovém řetězci je však možné, že tato horizontální metoda není vhodná v každém detailu pro všechny výrobky. Přesto se očekává, že potřebné modifikace budou co nejmenší, aby neznamenal významnou odchylku od této horizontální metody.

Tato technika je vhodná, mimo jiné, pro stanovení počtu mikroorganismů ve zkušebních vzorcích s minimálně 10 koloniemi napočítanými na misce. Toto odpovídá očekávané úrovni kontaminace vyšší než 10 KTJ/ml pro tekuté vzorky a vyšší než 100 KTJ/g pro pevné vzorky.

Konec náhledu - text dále pokračuje v placené verzi ČSN.