МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)
INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

**ГОСТ ISO 22964— 2024**

# МИКРОБИОЛОГИЯ ПИЩЕВОЙ ЦЕПИ

## Горизонтальный метод обнаружения

## *Cronobacter* spp.

**(ISO 22964:2017, IDT)**

**Издание официальное**

**Москва**
**Российский институт стандартизации**
**2025**

gost.e-ecolog.ru

## Предисловие

Цели, основные принципы и общие правила проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены ГОСТ 1.0 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, обновления и отмены»

**Сведения о стандарте**

1 ПОДГОТОВЛЕН Федеральным государственным бюджетным учреждением науки «Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи» (ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии») на основе собственного перевода на русский язык англоязычной версии стандарта, указанного в пункте 5.

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 31 октября 2024 г. № 178-П)

За принятие проголосовали:

| Краткое наименование страны по МК (ИСО 3166) 004—97 | Код страны по МК (ИСО 3166) 004—97 | Сокращенное наименование национального органа по стандартизации |
|---|---|---|
| Армения | AM | ЗАО «Национальный орган по стандартизации и метрологии» Республики Армения |
| Беларусь | BY | Госстандарт Республики Беларусь |
| Киргизия | KG | Кыргызстандарт |
| Россия | RU | Росстандарт |
| Узбекистан | UZ | Узбекское агентство по техническому регулированию |

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 26 декабря 2024 г. № 2008-ст межгосударственный стандарт ГОСТ ISO 22964—2024 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 ноября 2025 г. с правом досрочного применения.

5 Настоящий стандарт идентичен международному стандарту ISO 22964:2017 «Микробиология пищевой цепи. Горизонтальный метод обнаружения *Cronobacter* spp.» («Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection of *Cronobacter* spp.», IDT).

Международный стандарт подготовлен Европейским комитетом по стандартизации (CEN), Техническим комитетом CEN/TC 275 «Анализ пищевых продуктов. Горизонтальные методы определения» в сотрудничестве с подкомитетом SC 9 «Микробиология» Технического комитета ISO TC 34 «Пищевые продукты» в соответствии с соглашением по техническому сотрудничеству между ISO и CEN (Венское соглашение).

При применении настоящего стандарта рекомендуется использовать вместо ссылочных международных стандартов соответствующие им межгосударственные стандарты, сведения о которых приведены в дополнительном приложении ДА

6 ВЗАМЕН ГОСТ ISO/TS 22964—2013

*Информация о введении в действие (прекращении действия) настоящего стандарта и изменений к нему на территории указанных выше государств публикуется в указателях национальных стандартов, издаваемых в этих государствах, а также в сети Интернет на сайтах соответствующих национальных органов по стандартизации.*

*В случае пересмотра, изменения или отмены настоящего стандарта соответствующая информация будет опубликована на официальном интернет-сайте Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации в каталоге «Межгосударственные стандарты»*

© ISO, 2017
© Оформление. ФГБУ «Институт стандартизации», 2025

В Российской Федерации настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

## Содержание

1 Область применения . . . . . 1
2 Нормативные ссылки . . . . . 1
3 Термины и определения . . . . . 1
4 Сокращения . . . . . 1
5 Сущность метода . . . . . 2
5.1 Неселективное предварительное обогащение в ЗПВ . . . . . 2
5.2 Обогащение в селективной среде (CSB) . . . . . 2
5.3 Пересев и идентификация на хромогенном агаре (CCI-агар) . . . . . 2
5.4 Подтверждение . . . . . 2
6 Питательные среды и реагенты . . . . . 2
7 Оборудование и расходные материалы . . . . . 2
8 Отбор проб . . . . . 3
9 Подготовка анализируемых проб . . . . . 3
10 Проведение анализа . . . . . 3
10.1 Отбираемая навеска . . . . . 3
10.2 Предварительное обогащение . . . . . 3
10.3 Обогащение . . . . . 3
10.4 Выделение презумптивных *Cronobacter* spp. . . . . 4
10.5 Подтверждение . . . . . 4
10.6 Интерпретация результатов биохимических тестов . . . . . 6
11 Выражение результатов . . . . . 6
12 Рабочие характеристики метода . . . . . 6
13 Протокол испытаний . . . . . 6
Приложение А (обязательное) Схема процедуры испытаний . . . . . 7
Приложение В (обязательное) Состав, приготовление и определение рабочих характеристик питательных сред и реагентов . . . . . 8
Приложение С (справочное) Отличительные признаки *Cronobacter* spp. от микроорганизмов других родов . . . . . 14
Приложение D (справочное) Исследования по валидации метода и определению рабочих характеристик . . . . . 15
Приложение ДА (справочное) Сведения о соответствии ссылочных международных стандартов межгосударственным стандартам . . . . . 18
Библиография . . . . . 19

**М Е Ж Г О С У Д А Р С Т В Е Н Н Ы Й  С Т А Н Д А Р Т**

# МИКРОБИОЛОГИЯ ПИЩЕВОЙ ЦЕПИ

## Горизонтальный метод обнаружения *Cronobacter* spp.

Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection of *Cronobacter* spp.

**Дата введения — 2025—11—01**
**с правом досрочного применения**

## 1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает горизонтальный метод обнаружения *Cronobacter* spp.

Настоящий стандарт распространяется на следующие объекты:

- пищевые продукты и ингредиенты, предназначенные для потребления человеком и кормления животных,
- образцы окружающей среды из зоны производства и переработки пищевых продуктов.

## 2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие международные стандарты [для датированных ссылок применяют только указанное издание ссылочного стандарта, для недатированных — последнее издание (включая все изменения)]:

ISO 6887 (all parts), Microbiology of the food chain — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination (Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Подготовка проб для анализа, исходной суспензии и десятикратных разведений для микробиологических исследований)

ISO 7218, Microbiology of food and animal feeding stuffs — General requirements and guidance for microbiological examinations (Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования и рекомендации по микробиологическим исследованиям)

ISO 11133, Microbiology of food, animal feed and water — Preparation, production, storage and performance testing of culture media (Микробиология пищевых продуктов, кормов для животных и воды. Приготовление, производство, хранение и определение рабочих характеристик питательных сред)

## 3 Термины и определения

В настоящем стандарте применены следующие термины с соответствующими определениями:

3.1 ***Cronobacter* spp.:** Микроорганизмы, которые образуют типичные колонии на хромогенном агаре для выделения *Cronobacter* (CCI) [10] и проявляют характерные биохимические свойства, описанные при проведении испытаний в соответствии с настоящим стандартом.

3.2 **обнаружение *Cronobacter* spp.:** Определение *Cronobacter* spp. (3.1) в определенной массе или объеме продукта или на участке поверхности при проведении испытаний в соответствии с настоящим стандартом.

## 4 Сокращения

В настоящем стандарте применены следующие сокращения:

**Издание официальное**

ЗПВ — забуференная пептонная вода;
CCI — хромогенная среда для выделения *Cronobacter* (Chromogenic *Cronobacter* Isolation);
CSB — *Cronobacter* селективный бульон *(Cronobacter* selective broth);
TCA — триптон соевый агар.

## 5 Сущность метода

### 5.1 Неселективное предварительное обогащение в ЗПВ

Анализируемую навеску засевают в ЗПВ, инкубируют при температуре в диапазоне от 34 °С до 38 °С в течение (18 ± 2) ч.

Примечание — *Cronobacter* spp. могут присутствовать в небольшом количестве совместно с другими бактериями семейства *Enterobacteriaceae,* в частности *E. cloacae,* которые могут препятствовать их обнаружению.

### 5.2 Обогащение в селективной среде (CSB)

Селективную среду для обогащения засевают культурой, полученной по 5.1, и инкубируют при температуре (41,5 ± 1) °С в течение (24 ± 2) ч.

### 5.3 Пересев и идентификация на хромогенном агаре (CCI-агар)

Для выделения делают пересев штрихом на хромогенный агар из обогащенной культуры, полученной по 5.2, и инкубируют при температуре (41,5 ± 1) °С в течение (24 ± 2) ч.

### 5.4 Подтверждение

Отбирают типичные колонии с хромогенного агара, делают пересев до изолированных колоний на неселективном агаре, например TCA, и проводят тесты для выявления биохимических признаков.

## 6 Питательные среды и реагенты

Приготовление питательных сред проводят в соответствии с ISO 7218 и ISO 11133.

Состав питательных сред и реагентов и их приготовление приведены в приложении В.

Определение рабочих характеристик питательных сред проводят в соответствии с ISO 11133 и/или приложением В.

## 7 Оборудование и расходные материалы

Одноразовое оборудование является приемлемой альтернативой многоразовой стеклянной посуде, если оно имеет подходящие технические характеристики.

Используют лабораторное оборудование для микробиологических исследований согласно ISO 7218, в частности следующее.

7.1 Аппарат для сухой стерилизации (стерилизационный сушильный шкаф) или влажной стерилизации (автоклав) по ISO 7218.

7.2 Термостат, поддерживающий температуру в диапазоне от 34 °С до 38 °С, термостаты, поддерживающие температуру (37 ± 1) °С и (41,5 ± 1) °С.

7.3 Стерильные петли диаметром около 3 мм (объем 10 мм$^3$), объемом 1 мм$^3$ и иглы или петли для пересева.

7.4 pH-метр, имеющий точность калибровки ±0,1 единицы pH при температуре 25 °С.

7.5 Колбы и бутылки подходящей вместимости с крышками для приготовления и хранения питательных бульонов и агаров.

7.6 Стерильные градуированные пипетки или автоматические пипетки номинальной вместимостью 10 см$^3$, 1 см$^3$ и 0,1 см$^3$.

7.7 Пробирки (с пробками или с колпачками) или флаконы для культивирования соответствующей вместимости с нетоксичными металлическими колпачками с вкладышами или одноразовыми пластиковыми колпачками (см. ISO 7218).

7.8 Чашки Петри, диаметром 90 мм.

7.9 Спектрофотометр, способный измерять поглощение света при длине волны 405 нм.

7.10 Пестики и ступки.

7.11 Холодильник, поддерживающий температуру (5 ± 3) °С.

7.12 Водяные бани, поддерживающие температуру в диапазоне от 47 °С до 50 °С и (37 ± 1) °С.

7.13 Сушильный шкаф (или печь, вентилируемая путем конвекции), поддерживающий температуру в диапазоне от 25 °С до 50 °С.

## 8 Отбор проб

Отбор проб не является частью метода, изложенного в настоящем стандарте (см. конкретный международный стандарт, касающийся данного продукта).

Рекомендуемый метод отбора проб приведен в ISO/TS 17728 [3] для пищевых продуктов и кормов для животных, а также в ISO 18593 [4] для отбора проб с поверхностей.

Проба для проведения испытаний должна быть представительной, не поврежденной и не измененной в процессе транспортирования и временного хранения (см. ISO 7218).

## 9 Подготовка анализируемых проб

Подготовку анализируемых проб из лабораторной пробы необходимо осуществлять в соответствии со стандартом, касающимся соответствующего продукта: см. ISO 6887 (все части).

## 10 Проведение анализа (согласно схеме в приложении А)

### 10.1 Отбираемая навеска

В общем случае, для приготовления первичного разведения добавляют (10 ± 0,1) г или (10 ± 0,1) см$^3$ анализируемого образца (раздел 9) к 90 см$^3$ среды для предварительного обогащения (В.1) (ЗПВ), чтобы получить десятикратное разведение. Предварительно ЗПВ прогревают до комнатной температуры перед использованием. Для конкретных продуктов следуют процедурам, указанным в ISO 6887 (все части). Для сухого молока следуют ISO 6887-5.

Настоящий стандарт утвержден для навесок массой 10 г. Навески меньшей массы могут быть использованы без дополнительной валидации/верификации при условии, что сохраняется такое же соотношение между бульоном для предварительного обогащения и навеской. Навески большей массы, чем первоначально утвержденные, могут быть использованы, если при исследовании по валидации/верификации не было выявлено отрицательного влияния на обнаружение *Cronobacter* spp.

Примечания

1 Валидация может быть проведена согласно соответствующим протоколам, представленным в ISO 16140 (все части). Верификация для объединения образцов может проводиться в соответствии с протоколом, описанным в ISO 6887-1:2017, приложение D (протокол проверки для объединения образцов для качественных испытаний).

2 Большая масса анализируемого образца может отрицательно сказаться на восстановлении *Cronobacter* spp. в стрессовом состоянии, при наличии сопутствующей микрофлоры, например пробиотиков [5], [6].

При исследовании образцов массой более 10 г ЗПВ следует предварительно нагреть до температуры от 34 °С до 38 °С (7.2) перед внесением навески.

### 10.2 Предварительное обогащение

Инкубируют инокулированную среду для предварительного обогащения, приготовленную по 10.1 при температуре от 34 °С до 38 °С (7.2) в течение (18 ± 2) ч.

### 10.3 Обогащение

После инкубации инокулированную среду предварительного обогащения хорошо перемешивают и переносят 0,1 см$^3$ культуры, полученной по 10.2, в 10 см$^3$ CSB-бульона (В.2) и тщательно перемешивают. Инкубируют при температуре (41,5 ± 1) °С (7.2) в течение (24 ± 2) ч.

### 10.4 Выделение презумптивных *Cronobacter* spp.

Чашки с CCI-агаром (В.3) прогревают до комнатной температуры, если они хранились при более низкой температуре. При необходимости высушивают поверхность чашек (7.13) согласно процедуре, приведенной в ISO 11133.

Хорошо перемешивают обогащенную культуру и делают из нее пересев с помощью 10 мм$^3$ петли (7.3) на поверхность CCI-агара (В.3), чтобы получить хорошо изолированные колонии. Инкубируют чашки при температуре (41,5 ± 1) °С (7.2) в течение (24 ± 2) ч.

После инкубации просматривают чашки с хромогенной средой на наличие типичных колоний презумптивных *Cronobacter*.

Типичные колонии *Cronobacter* на CCI-агаре образуют колонии небольшого или среднего размера (от 1 до 3 мм) и имеют цвет от синего до сине-зеленого. Нетипичные колонии часто белые или белые с зеленым центром, серые или черные. Некоторые естественно пигментированные колонии, не относящиеся к *Cronobacter*, могут выглядеть желтыми или красными.

### 10.5 Подтверждение

#### 10.5.1 Общие положения

Для подтверждения из селективной среды CCI (см. 10.4) делают пересев штрихом пяти отмеченных типичных или подозрительных колоний. В случае, если колонии плохо разделены, необходимо снова рассеять типичную колонию на селективный агар (В.3).

Если на чашке меньше пяти типичных или подозрительных колоний, отбирают все отмеченные колонии для подтверждения.

Для биохимического подтверждения используют чистые культуры.

#### 10.5.2 Очистка колоний

Пересевают отобранные колонии штрихом на поверхность неселективного агара, например TCA (В.4), чтобы получить хорошо изолированные колонии.

Чашки инкубируют в перевернутом виде при температуре от 34 °С до 38 °С (7.2) в течение (21 ± 3) ч.

Если культуры на неселективном агаре перемешаны, пересевают подозрительную колонию на дополнительную чашку неселективного агара и инкубируют при температуре от 34 °С до 38 °С (7.2) в течение (21 ± 3) ч, чтобы получить чистую культуру.

Допускается сначала протестировать наиболее характерную колонию, отобранную с чашки с селективным агаром. В случае положительного результата нет необходимости тестировать другие колонии. В случае отрицательного результата тестируют другие отобранные колонии до тех пор, пока не будет обнаружено отрицательного результата для всех колоний либо положительного результата.

Штаммы могут храниться на неселективном агаре при температуре (5 ± 3) °С (7.11), но не более семи дней. Необходимо проводить пересевы колоний для получения свежей культуры перед выполнением подтверждающих тестов.

#### 10.5.3 Биохимическое подтверждение

10.5.3.1 Общие положения

Проводят подтверждающие испытания, указанные в таблице 1.

Таблица 1 — Подтверждающие тесты для определения *Cronobacter* spp.

| | |
|---|---|
| Оксидаза | Кислота из: |
| Гидролиз 4-нитрофенил α-D-глюкопиранозидного субстрата | D-арабита<br>D-сорбита |
| L-лизин декарбоксилаза | D-сахарозы |
| L-орнитин декарбоксилаза | α-Метил-D-глюкозида (дополнительно) |
| Метиловый красный (дополнительно) | |
| Фогес-Проскауэр (дополнительно) | |

Примечания

1 Допускается использование настольных тест-панелей для биохимической идентификации *Cronobacter* spp, если доказана их надежность (ISO 7218).

2 Допускается использование других альтернативных процедур для подтверждения принадлежности изолята к *Cronobacter* spp., при условии верификации пригодности альтернативной процедуры (ISO 7218).

10.5.3.2 Оксидаза

С использованием платино-иридиевой или пластиковой петли (7.3) берут часть хорошо изолированной колонии с каждой отдельной чашки (10.5.2) и наносят штрихом на фильтровальную бумагу, смоченную оксидазным реагентом (B.5.1); появление лилового, фиолетового или темно-синего цвета в течение 10 с свидетельствует о положительной реакции. Если используются коммерчески доступные наборы для оксидазного теста, следуют инструкциям изготовителя.

Типичные *Cronobacter* spp. оксидазоотрицательные.

10.5.3.3 Гидролиз 4-нитрофенил (PNP) α-D-глюкопиранозидного субстрата

С использованием петли (7.3) суспендируют отдельную колонию, выращенную на неселективном агаре, например TCA (10.5.2), в 2 $см^3$ физиологического солевого раствора, 0,85 % NaCl (B.5.2.4). Добавляют 2 $см^3$ раствора для ферментативного анализа α-глюкозидазы (B.5.2). Инкубируют на водяной бане при температуре (37 ± 1) °C (7.12) в течение 4 ч и измеряют образование желтой окраски на спектрофотометре (7.9) при 405 нм. Минимальное поглощение 0,3 при 405 нм через 4 часа, что эквивалентно 16 мМ PNP, можно считать положительным.

Типичные *Cronobacter* spp. способны гидролизовать 4-нитрофенил α-D-глюкопиранозид.

10.5.3.4 L-лизиндекарбоксилаза

С использованием петли (7.3) пересевают каждую из выбранных колоний (10.5.2) в L-лизиндекарбоксилазную среду (B.5.3) ниже уровня поверхности среды. Инкубируют пробирки при температуре (37 ± 1) °C (7.2) в течение (24 ± 2) ч.

Фиолетовый цвет после инкубации свидетельствует о положительной реакции. Желтый цвет свидетельствует об отрицательной реакции.

Типичные *Cronobacter* spp. не способны декарбоксилировать L-лизин.

10.5.3.5 L-орнитиндекарбоксилаза

С использованием петли (7.3) пересевают каждую из выбранных колоний (10.5.2) в L-орнитиндекарбоксилазную среду (B.5.4) ниже уровня поверхности среды. Инкубируют пробирки при температуре (37 ± 1) °C (7.2) в течение (24 ± 2) ч.

Фиолетовый цвет после инкубации свидетельствует о положительной реакции. Желтый цвет свидетельствует об отрицательной реакции.

Большинство штаммов *Cronobacter* spp. способны декарбоксилировать L-орнитин.

10.5.3.6 Ферментация различных углеводов

С использованием петли (7.3) пересевают каждую из выбранных колоний в среду для определения ферментации углеводов (B.5.5) ниже уровня поверхности среды. Инкубируют пробирки при температуре (37 ± 1) °C (7.2) в течение (48 ± 2) ч.

Желтый цвет после инкубации свидетельствует о положительной реакции. Красный цвет свидетельствует об отрицательной реакции.

Типичные *Cronobacter* spp. способны вырабатывать кислоту из D-сахарозы и не способны вырабатывать кислоту из D-сорбита. Большинство штаммов *Cronobacter* spp. способны вырабатывать кислоту из α-Метил-D-глюкозида и не способны вырабатывать кислоту из D-арабита.

10.5.3.7 Метиловый красный (MR) (дополнительно)

С использованием петли (7.3) пересевают каждую из выбранных колоний (10.5.2) в пробирку с бульоном MR-VP (B.5.6) ниже уровня поверхности среды. Инкубируют пробирки при температуре (37 ± 1) °C (7.2) в течение (48 ± 2) ч. Добавляют пять капель раствора метилового красного (B.5.6.2) в каждую пробирку. Четкий красный цвет свидетельствует о положительной реакции. Желтый цвет свидетельствует об отрицательной реакции.

Большинство штаммов *Cronobacter* spp. не дают положительную реакцию с метиловым красным.

10.5.3.8 Фогес-Праскауэр (VP) (дополнительно)

С использованием петли (7.3) пересевают каждую из выбранных колоний (10.5.2) в пробирку с бульоном MR-VP (B.5.6) ниже уровня поверхности среды. Инкубируют пробирки при температуре (37 ± 1) °C (7.2) в течение (48 ± 2) ч. Добавляют 0,2 $см^3$ 40 %-ного KOH (B.5.6.3.1) и 0,6 $см^3$ раствора 1-нафтола (B.5.6.3.2). Оставляют на (1 ± 0,5) ч. Эозиновый розовый цвет вокруг поверхности среды свидетельствует о положительной реакции.

Большинство штаммов *Cronobacter* spp. дают положительную реакцию Фогеса Проскауэра.

### 10.6 Интерпретация результатов биохимических тестов

*Cronobacter* spp. оксидазоотрицательные, способны гидролизовать 4-нитрофенил α-D-глюкопиранозид и вырабатывать кислоту из сахарозы. Они не способны декарбоксилировать L-лизин и вырабатывать кислоту из D-сорбита. Очень немногие штаммы *Cronobacter* дают положительную реакцию с метиловым красным, также очень редкой является отрицательная реакция Фогеса Проскауэра. *Cronobacter* spp. можно отличить от близких представителей семейства *Enterobacteriaceae* по характеристикам, приведенным в приложении С.

Примечание — Определение термина *Cronobacter* spp. приведено в ссылках [9] и [11].

## 11 Выражение результатов

В соответствии с результатами биохимических испытаний и их интерпретацией приводят данные о наличии/отсутствии *Cronobacter* spp. в анализируемой навеске х г или х $см^3$ продукта (см. ISO 7218).

## 12 Рабочие характеристики метода

### 12.1 Межлабораторные исследования

Точность (воспроизводимость) метода была определена в межлабораторном исследовании путем определения специфичности, чувствительности и, по возможности, $LOD_{50}$ для этого метода. Данные приведены в приложении D. Значения, полученные при межлабораторном исследовании, могут быть неприменимы к типам пищевых продуктов, отличным от указанных в приложении D.

### 12.2 Чувствительность

Чувствительность определяется как количество проб, признанных положительными, деленное на количество проб, испытанных при заданном уровне загрязнения. Таким образом, результаты зависят от уровня загрязнения образца.

### 12.3 Специфичность

Специфичность определяется как количество проб, признанных отрицательными, деленное на количество незараженных проанализированных образцов.

### 12.4 $LOD_{50}$ (Предел обнаружения 50 % образцов)

$LOD_{50}$ — это концентрация (КОЕ/образец), для которой вероятность обнаружения составляет 50 %.

## 13 Протокол испытаний

В протоколе испытаний должна содержаться, как минимум, следующая информация:

a) используемый метод отбора проб, если он известен;

b) используемый метод испытаний со ссылкой на настоящий стандарт;

c) полученные результаты анализа;

d) все условия эксплуатации, не указанные в настоящем стандарте или рассматриваемые как дополнительные, совместно с подробной информацией о любых инцидентах, которые могли оказать влияние на результаты анализа;

e) вся информация, необходимая для полной идентификации образца.

**Приложение А**
**(обязательное)**

## Схема процедуры испытаний

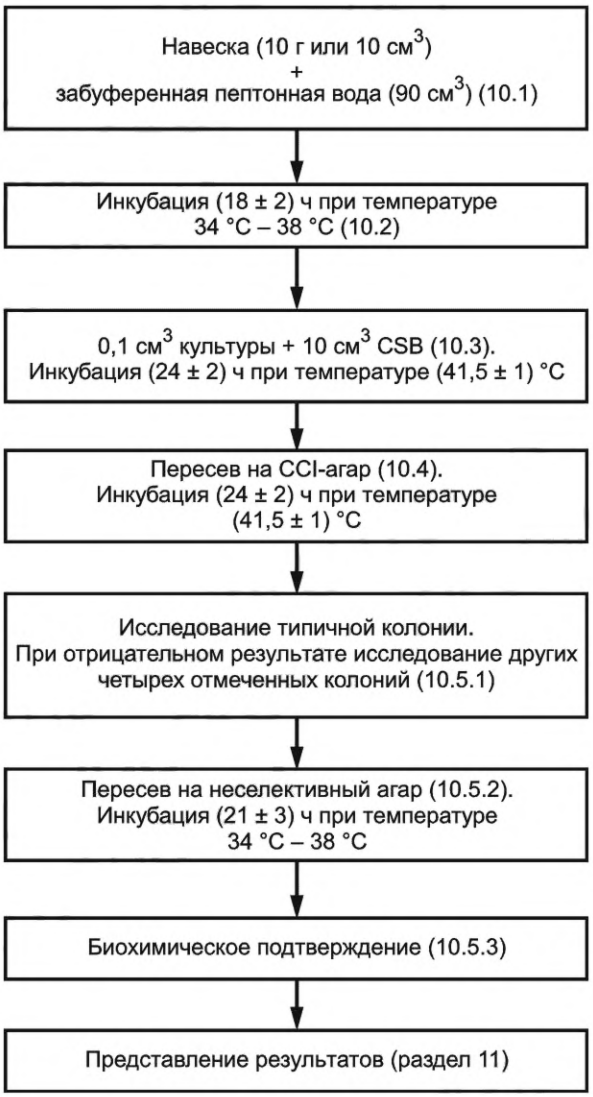



Рисунок А.1 — Схема обнаружения бактерий рода *Cronobacter spp.* в пищевых продуктах, кормах для животных и пробах окружающей среды из зоны производства пищевых продуктов

**Приложение В**
**(обязательное)**

## Состав, приготовление и определение рабочих характеристик питательных сред и реагентов

### В.1 Забуференная пептонная вода (ЗПВ)

#### В.1.1 Состав

| | |
|---|---|
| Пептон[a] | 10,0 г |
| Натрий хлористый (NaCl) | 5,0 г |
| Натрий фосфорнокислый двузамещенный 12-водный ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$) | 9,0 г |
| Калий фосфорнокислый однозамещенный ($KH_2PO_4$) | 1,5 г |
| Вода | 1000 $см^3$ |

[a] Например, ферментативный гидролизат казеина.

#### В.1.2 Приготовление

Компоненты растворяют в воде, при необходимости нагревают. При необходимости устанавливают pH, чтобы после стерилизации он составлял (7,0 ± 0,2) при температуре 25 °С.

Среду разливают в колбы (7.5) подходящей вместимости, чтобы получить порции, необходимые для анализа.

Стерилизуют автоклавированием (7.1) при температуре 121 °С в течение 15 мин. Среду хранят в закрытых колбах при температуре (5 ± 3) °С (7.11) до шести месяцев.

### В.2 *Cronobacter* селективный бульон (CSB)

#### В.2.1 Основа среды

В.2.1.1 Состав

| | |
|---|---|
| Ферментативный гидролизат животных тканей | 10,0 г |
| Мясной экстракт | 3,0 г |
| Натрий хлористый (NaCl) | 5,0 г |
| Бромкрезоловый пурпурный | 0,04 г |
| Сахароза ($C_{12}H_{22}O_{11}$) | 10,0 г |
| Вода | 1000 $см^3$ |

В.2.1.2 Приготовление

Каждый из компонентов растворяют в воде, при необходимости нагревают.

При необходимости устанавливают pH, чтобы после стерилизации он составлял (7,4 ± 0,2) при температуре 25 °С. Разливают основу среды по 10 $см^3$ в пробирки (7.7). Стерилизуют пробирки автоклавированием (7.1) при температуре 121 °С в течение 15 мин. Среду хранят при температуре (5 ± 3) °С (7.11) не более шести месяцев.

#### В.2.2 Раствор ванкомицина

В.2.2.1 Состав

| | |
|---|---|
| Ванкомицина гидрохлорид (CAS № 1404-93-9) | 10 мг |
| Вода | 10 $см^3$ |

В.2.2.2 Приготовление

Растворяют ванкомицин в дистиллированной воде. Перемешивают и стерилизуют фильтрацией через фильтр с размером пор 0,2 мкм.

Раствор ванкомицина хранят при температуре (5 ± 3) °С (7.11) не более 15 дней.

**B.2.3 Готовая среда**

В асептических условиях добавляют 0,1 см$^3$ раствора ванкомицина (B.2.2) к 10 см$^3$ основы среды (B.2.1), чтобы конечная концентрация ванкомицина составила 10 мг на 1 дм$^3$ CSB. Готовую среду CSB хранят при температуре (5 ± 3) °C (7.11) не более одного дня.

**B.3 Хромогенная среда для выделения *Cronobacter* (CCI)**

**B.3.1 Состав**

| | |
|---|---|
| Триптический гидролизат казеина | 7,0 г |
| Дрожжевой экстракт | 3,0 г |
| Натрий хлористый (NaCl) | 5,0 г |
| 5-бром-4-хлор-3-индолил-α-D-глюкопиранозид | 0,15 г |
| Натрия дезоксихолат ($C_{24}H_{39}NaO_4$) | 0,25 г |
| Железо (III) аммоний цитрат ($C_6H_8O_7FeNH_3$) | 1 г |
| Натрия тиосульфат ($Na_2S_2O_3$) | 1 г |
| Агар | 9,0—18,0 г[a] |
| Вода | 1000 см$^3$ |
| [a] В зависимости от гелеобразующей способности агара. | |

**B.3.2 Приготовление**

Измельчают 5-бром-4-хлор-3-индолил-α-D-глюкопиранозид с хлористым натрием с использованием ступки и пестика (7.10), чтобы получить равномерно распределенный мелкий порошок 5-бром-4-хлор-3-индолил-α-D-глюкопиранозида. Остальные компоненты растворяют в воде при кипячении, прекращают нагрев и добавляют смесь хлористого натрия с 5-бром-4-хлор-3-индолил-α-D-глюкопиранозидом. При необходимости устанавливают такой pH (7.4), чтобы после стерилизации он составил (7,3 ± 0,2) при температуре 25 °C.

Стерилизуют автоклавированием (7.1) при температуре 121 °C в течение 15 мин. Охлаждают до температуры 47 °C — 50 °C. Разливают в стерильные пустые чашки Петри (7.8) примерно по 18—20 см$^3$ CCI-агара и дают застыть на прохладной ровной поверхности. Среду хранят при температуре (5 ± 3) °C (7.11) не более 14 дней.

**B.4 Триптон-соевый агар (TCA, пример неселективной среды)**

**B.4.1 Состав**

| | |
|---|---|
| Ферментативный гидролизат казеина | 15,0 г |
| Ферментативный гидролизат сои | 5,0 г |
| Натрий хлористый (NaCl) | 5,0 г |
| Агар | 9,0—18,0 г[a] |
| Вода | 1000 см$^3$ |
| [a] В зависимости от гелеобразующей способности агара. | |

**B.4.2 Приготовление**

Растворяют каждый из компонентов в воде при кипячении. При необходимости устанавливают такой pH (7.4), чтобы после стерилизации он составил (7,3 ± 0,2) при температуре 25 °C. Стерилизуют автоклавированием (7.1) при температуре 121 °C в течение 15 мин. Охлаждают до температуры 47 °C—50 °C. Разливают в стерильные пустые чашки Петри (7.8) примерно по 18—20 см$^3$ TCA, дают застыть на прохладной ровной поверхности. Среду хранят в соответствии с ISO 11133.

**B.5 Среды и реагенты для биохимических испытаний**

**B.5.1 Реагент для обнаружения оксидазы**

B.5.1.1 Состав

| | |
|---|---|
| N,N,N',N'-тетраметил-п-фенилендиамин дигидрохлорид ($C_{10}H_{16}N_2 \cdot 2HCl$) | 1,0 г |
| ВодаN,N,N',N' | 100 $см^3$ |

B.5.1.2 Приготовление

Растворяют компонент в воде непосредственно перед использованием.

**B.5.2 Раствор для ферментативного анализа α-глюкозидазы**

B.5.2.1 Фосфатный буфер, 0,3 М (pH 7,0)

B.5.2.1.1 Состав

| | |
|---|---|
| Натрий фосфорнокислый однозамещенный 1-водный ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$) | 1,75 г |
| Натрий фосфорнокислый двузамещенный 7-водный ($Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$) | 4,64 г |
| Вода | 90 $см^3$ |

B.5.2.1.2 Приготовление

Компоненты растворяют в стерильной воде и хранят при температуре (5 ± 3) °С (7.11) не более 15 дней.

B.5.2.2 4-нитрофениловый α-D-глюкопиранозидный субстрат

B.5.2.2.1 Состав

| | |
|---|---|
| *4*-нитрофенил α-D-глюкопиранозид ($C_{12}H_{15}NO_8$) | 0,4 г |
| Вода | 10 $см^3$ |

B.5.2.2.2 Приготовление

Компонент растворяют в воде при температуре 50 °С непосредственно перед использованием.

B.5.2.3 Готовая среда

Добавляют 10 $см^3$ 4-нитрофенил α-D-глюкопиранозидного субстрата (B.5.2.2) к 90 $см^3$ фосфатного буфера (B.5.2.1), чтобы получить конечную концентрацию 4-нитрофенил α-D-глюкопиранозида 0,4 г на 100 $см^3$ раствора для ферментативного анализа α-глюкозидазы.

Готовый раствор для ферментативного анализа α-глюкозидазы хранят при температуре (5 ± 3) °С (7.11) не более одного дня.

B.5.2.4 Физиологический солевой раствор 0,85 % NaCl.

B.5.2.4.1 Состав

| | |
|---|---|
| Натрий хлористый (NaCl) | 0,85 г |
| Вода | 100 $см^3$ |

B.5.2.4.2 Приготовление

Компонент растворяют в воде и хранят при температуре (5 ± 3) °С (7.11) не более 15 дней.

**B.5.3 L-лизиндекарбоксилазная среда**

B.5.3.1 Состав

| | |
|---|---|
| L-лизина моногидрохлорид ($C_6H_{14}N_2O_2 \cdot HCl$) | 5 г |
| Дрожжевой экстракт | 3 г |
| Глюкоза ($C_6H_{12}O_6$) | 1 г |
| Бромкрезоловый пурпурный | 0,015 г |
| Вода | 1000 $см^3$ |

B.5.3.2 Приготовление

Компоненты растворяют в воде, при необходимости нагревают. При необходимости устанавливают такой pH, чтобы после стерилизации он составил (6,8 ± 0,2) при температуре 25 °С. Среду разливают по 5 $см^3$ в пробирки (7.7).

Стерилизуют автоклавированием (7.1) при температуре 121 °С в течение 15 мин. Пробирки со средой хранят при температуре (5 ± 3) °С (7.11) не более трех месяцев.

**B.5.4 L-орнитиндекарбоксилазная среда**

B.5.4.1 Состав

| | |
|---|---|
| L-орнитина моногидрохлорид ($C_5H_{12}N_2O_2 \cdot HCl$) | 10 г |
| Дрожжевой экстракт | 3 г |
| Глюкоза ($C_6H_{12}O_6$) | 1 г |
| Бромкрезоловый пурпурный | 0,015 г |
| Вода | 1000 $см^3$ |

B.5.4.2 Приготовление

Компоненты растворяют в воде, при необходимости нагревают. При необходимости устанавливают такой pH, чтобы после стерилизации он составил (6,8 ± 0,2) при температуре 25 °C. Среду разливают по 5 $см^3$ в пробирки (7.7).

Стерилизуют автоклавированием (7.1) при температуре 121 °C в течение 15 мин. Пробирки со средой хранят при температуре (5 ± 3) °C (7.11) не более трех месяцев.

**B.5.5 Среда для ферментации углеводов (пептонная вода с феноловым красным, D-арабитом, α-метил-D-глюкозидом, D-сорбитом и D-сахарозой)**

B.5.5.1 Основа среды

B.5.5.1.1 Состав

| | |
|---|---|
| Ферментативный гидролизат казеина | 10 г |
| Натрий хлористый (NaCl) | 5 г |
| Феноловый красный | 0,02 г |
| Вода | 1000 $см^3$ |

B.5.5.1.2 Приготовление

Растворяют компоненты в воде, при необходимости нагревают. При необходимости устанавливают такой pH, чтобы после стерилизации он составил (6,8 ± 0,2) при температуре 25 °C.

Разливают основу среды в колбы (7.5) подходящей вместимости. Стерилизуют автоклавированием (7.1) при температуре 121 °C в течение 15 мин. Среду хранят при температуре (5 ± 3) °C (7.11) не более шести месяцев.

B.5.5.2 Раствор углеводов D-арабитола ($C_5H_{12}O_5$), α-метил-D-глюкозида ($C_7H_{14}O_6$), D-сорбита ($C_6H_{14}O_6$) и D-сахарозы ($C_{12}H_{22}O_{11}$) 80 мг/$см^3$

B.5.5.2.1 Состав

| | |
|---|---|
| Углевод | 8 г |
| Вода | 100 $см^3$ |

B.5.5.2.2 Приготовление

Каждый из четырех углеводных компонентов отдельно растворяют в воде для получения четырех углеводных растворов. Стерилизуют все растворы путем фильтрации через фильтр с размером пор 0,2 мкм. Среду хранят при температуре (5 ± 3) °C (7.11) не более шести месяцев.

B.5.5.3 Готовая среда для ферментации углеводов

B.5.5.3.1 Состав

| | |
|---|---|
| Основа среды (B.5.5.1) | 875 $см^3$ |
| Раствор углеводов (B.5.5.2) | 125 $см^3$ |

B.5.5.3.2 Приготовление

Среды готовят отдельно для каждого углевода. В асептических условиях добавляют приготовленный раствор каждого из углеводов (B.5.5.2) к основе среды (B.5.5.1) и перемешивают. Разливают готовые среды для ферментации каждого углевода по 10 $см^3$ в стерильные пробирки (7.7) в асептических условиях.

Готовые углеводные среды готовят в день использования.

**B.5.6 Реагенты для реакции с метиловым красным (MR) и реакции Фогеса-Праскауэра (VP)**

B.5.6.1 MR/VP основа среды

B.5.6.1.1 Состав

| | |
|---|---|
| Ферментативный гидролизат тканей животных | 7 г |
| D-глюкоза | 5 г |
| Калий фосфорнокислый двузамещенный ($K_2HPO_4$) | 5 г |
| Вода | 100 $см^3$ |

B.5.6.1.2 Приготовление

Компоненты растворяют в воде, при необходимости нагревают. При необходимости устанавливают такой pH, чтобы после стерилизации он составил (6,9 ± 0,2) при температуре 25 °C.

Разливают по 10 $см^3$ в пробирки (7.7). Стерилизуют автоклавированием (7.1) при температуре 121 °C в течение 15 мин. Среду хранят при температуре (5 ± 3) °C (7.11) не более шести месяцев.

B.5.6.2 Реагент метиловый красный (MR)

B.5.6.2.1 Состав

| | |
|---|---|
| Метиловый красный ($C_{15}H_{15}N_3O_2$) | 0,03 г |
| Этиловый спирт | 85,5 $см^3$ |
| Вода | 4,5 $см^3$ |

B.5.6.2.2 Приготовление

Растворяют метиловый красный в смеси этанола и воды. Стерилизация не требуется. Реагент хранят при комнатной температуре 20 °C—25 °C.

B.5.6.3 Реагент Фогеса-Проскауэра (VP)

B.5.6.3.1 40 %-ный раствор KOH

B.5.6.3.1.1 Состав

| | |
|---|---|
| Калия гидроокись (KOH) | 40 г |
| Вода | 100 $см^3$ |

B.5.6.3.1.2 Приготовление

Растворяют компонент в воде. Стерилизация не требуется. Раствор хранят при комнатной температуре 20 °C—25 °C.

B.5.6.3.2 5 %-ный раствор 1-Нафтола

B.5.6.3.2.1 Состав

| | |
|---|---|
| 1-Нафтол ($C_{10}H_7OH$) | 5 г |
| Этанол | 100 $см^3$ |

B.5.6.3.2.2 Приготовление

Растворяют 1-нафтол в этаноле. Стерилизация не требуется. Раствор хранят при комнатной температуре 20 °C—25 °C.

### B.6 Определение рабочих характеристик питательных сред и реактивов

Проверяют рабочие характеристики питательных сред и реагентов в соответствии с методами и критериями, описанными в ISO 11133, см. таблицу B.1.

Таблица В.1 — Определение рабочих характеристик для обеспечения качества питательных сред

| Среда | Тип[a] | Характеристика[a] | Условия инкубации | Контрольные штаммы | Номера WDCM[c] | Метод контроля | Критерий | Типичная реакция |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ЗПВ [g] | Ж | Производительность | (18 ± 2) ч/от 34 °С до 38 °С | *Cronobacter sakazakii*<br>*Cronobacter muytjensii* | 00214[b]<br>00213 | Качественный | Мутность (1—2)[e] | — |
| CSB | Ж | Производительность | (24 ± 2) ч/<br>(41,5 ± 1) °С | *Cronobacter sakazakii* + *Staphylococcus aureus*[d] | 00214<br>00032 или 00034 | Качественный | Изменение цвета CSB > 10 колоний на CCI | Желтый цвет.<br>Колонии на CCI небольшого или среднего размера (от 1 до 3 мм), имеющие цвет от синего до сине-зеленого |
| | | | | *Cronobacter muytjensii* +*Staphylococcus aureus*[d] | 00213<br>00032 или 00034 | | | |
| | | Селективность | (24 ± 2) ч/<br>(41,5 ± 1) °С | *Staphylococcus aureus*[d] | 00032 или 00034 | Качественный | Полное или частичное ингибирование на ТСА ≤100 | Фиолетовый цвет CSB |
| CCI | А | Производительность | (24 ± 2) ч<br>(41,5 ± 1) °С | *Cronobacter sakazakii*<br>*Cronobacter muytjensii* | 00214[b]<br>00213 | Качественный | Хороший рост (2) [f] | Колонии небольшого или среднего размера (от 1 до 3 мм), имеющие цвет от синего до сине-зеленого |
| | | Селективность | | *Staphylococcus aureus*[d] | 00032 или 00034 | Качественный | Отсутствие роста (0)[f] | — |
| | | Селективность | | *Enterobacter cloacae* | 00083 | Качественный | Рост (1—2)[f] | Колонии, не имеющие зеленого или сине-зеленого цвета |

[a] Ж — жидкая среда, А — агаризованная среда.

[b] Минимальный набор штаммов, которые необходимо использовать.

[c] Ссылка на каталог референсных штаммов www.wfcc.info для информации по номерам штаммов в коллекциях , контактных данных, WDCM (World Data Centre for Microorganisms): Международный центр данных по микроорганизмам.

[d] Штамм на выбор; необходимо использовать как минимум один из штаммов.

[e] Мутность подразделяется на следующие категории: 0 — отсутствие мутности; 1 — легкая мутность; 2 — выраженная мутность (см. ISO 11133).

[f] Рост подразделяется на следующие категории: 0 — нет роста; 1 — слабый рост (частичное ингибирование); 2 — хороший рост (см. ISO 11133).

[g] Сведения о многофункциональных средах см. в ISO 11133.

## Приложение С
## (справочное)

## Отличительные признаки *Cronobacter* spp. от микроорганизмов других родов

Таблица С.1 — Отличительные признаки *Cronobacter* spp. от микроорганизмов других родов

| Тест | *Cronobacter*[a] | | | | | *Enterobacter* и родственные виды [b] | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | *C. dublinensis* | *C. malonaticus* | *C. condimenti*/*C. muytjensii* | *C. sakazakii* | *C. turicensis*/*C. universalis* | *E. aerogenes* | *E. cancerogenus* | *E. cloacae*[c] | *E. gergoviae*[e] | *F. helveticus*[d] | *E. hormaechei* | *F. pulveris*[d] | *S. turicensis*[d] |
| Оксидаза | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Гидролиз 4-NP α-D-глюкозида | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 0 | 0 | 1 | 0 | 100 | 0 | 100 | 100 |
| Лизин декарбоксилаза | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 98 | 0 | 0 | 90 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Орнитин декарбоксилаза | 100 | 95 | 100 | 94 | 90 | 98 | 100 | 96 | 100 | 0 | 91 | 0 | 0 |
| Метиловый красный | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 5 | 0 | 5 | 5 | 91 | 57 | 83 | 100 |
| Фогес-Проскауэр | 100 | 100 | 100 | 99 | 100 | 98 | 100 | 100 | 100 | 9 | 100 | 17 | 0 |
| Кислота из: | | | | | | | | | | | | | |
| D-арабита | 17 | 0 | 0 | 0 | 10 | 100 | 0 | 15 | 97 | 91 | 0 | 83 | 100 |
| α-метил-D-глюкозида | 100 | 100 | 0 | 100 | 100 | 95 | 0 | 85 | 2 | 0 | 83 | 0 | 0 |
| D-сорбита | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 | 95 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| D-сахарозы | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 0 | 97 | 98 | 0 | 100 | 100 | 0 |

Цифры означают процент положительных штаммов.

[a] Согласно ссылкам [7], [8], [9] и [11].

[b] Согласно ссылкам [12], [13] и [14].

[c] Аналогичные процентные соотношения получены для других видов комплекса *E. cloacae*, например, *E. asburiae*, *E. amnigenus*, *E. intermedium*, *E. nimipressuralis* (за исключением *E. nimipressuralis*, не вырабатывающего кислоту из D-сахарозы).

[d] *Franconibacter helveticus, Franconibacter pulveris* и *Siccibacter turicensis* могут проявляться как презумптивные положительные колонии на CCI-агаре.

[e] Аналогичные процентные соотношения получены для *E. pyrinus.*

**Приложение D**
**(справочное)**

## Исследования по валидации метода и определению рабочих характеристик

### D.1 Результаты межлабораторных исследований

Были проведены международные межлабораторные исследования с участием 14—17 сотрудников из девяти стран. В качестве матриц для валидации метода были использованы наиболее типичные виды пищевых продуктов, ингредиентов или образцов, исследованных на наличие *Cronobacter* spp.: смеси для детского питания на молочной основе; смеси для детского питания на соевой основе; лактоза; образцы крахмала и пробы окружающей среды. Каждый из образцов тестировался на двух разных уровнях загрязнения плюс отрицательный контроль. Исследование было организовано в 2013 году AINIA, Валенсия, Испания, в рамках мандата CEN M/381 от Европейской комиссии.

Межлабораторное исследование проводилось в соответствии с методикой, изложенной в настоящем стандарте. Для подтверждения колоний были использованы настольные тест-панели (ISO 7218). Значения рабочих характеристик, полученные в результате межлабораторных исследований, приведены по типам проб в таблицах D.1—D.5. Данные, полученные некоторыми сотрудниками, были исключены из расчетов только на основании четко определенных технических причин (отклонений от протокола).

Уровень заражения, представленный в таблицах, соответствует определению количества бактерий в инокуляте методом посева на агар. В образцах, где был оценен $LOD_{50}$, размер инокулята, использованный для расчетов, представлял собой наиболее вероятное число (НВЧ), подсчитанное на искусственно зараженных образцах при низком уровне заражения.

Таблица D.1 — Результаты анализа данных, полученных при анализе сухой смеси для детского питания на молочной основе

| Рабочие характеристики | Незараженный | Низкий уровень заражения[a] (4 КОЕ/10 г) | Высокий уровень заражения[a] (55 КОЕ/10 г) |
|---|---|---|---|
| Количество участвующих лабораторий | 17 | 17 | 17 |
| Количество лабораторий, отобранных после оценки данных | 15 | 15 | 15 |
| Количество образцов в лаборатории | 8 | 8 | 8 |
| Количество образцов, отобранных после оценки данных | 120 | 88 | 120 |
| Размер образца (г/см$^3$/см$^2$/шт.) | 10 | 10 | 10 |
| Чувствительность, % | — | — | 100 |
| Специфичность, % | 99 | — | — |
| $LOD_{50}$, (95 %-ный доверительный интервал) КОЕ/навеску | — | 1,1 (от 0,8 до 1,4) | |

[a] Детская сухая смесь на молочной основе (коммерчески доступная), содержащая бифидобактерии в количестве от $1{,}0 \cdot 10^6$ — $1{,}0 \cdot 10^7$ КОЕ/г, искусственно зараженная *Cronobacter sakazakii.*

Таблица D.2 — Результаты анализа данных, полученных при анализе сухой смеси для детского питания на соевой основе

| Рабочие характеристики | Незараженный | Низкий уровень заражения[a] (4 КОЕ/10 г) | Высокий уровень заражения[a] (50 КОЕ/10 г) |
|---|---|---|---|
| Количество участвующих лабораторий | 16 | 16 | 16 |

*Окончание таблицы D.2*

| Рабочие характеристики | Незараженный | Низкий уровень заражения[a] (4 КОЕ/10 г) | Высокий уровень заражения[a] (50 КОЕ/10 г) |
|---|---|---|---|
| Количество лабораторий, отобранных после оценки данных | 14 | 14 | 14 |
| Количество образцов в лаборатории | 8 | 8 | 8 |
| Количество образцов, отобранных после оценки данных | 109 | 112 | 112 |
| Размер образца (г/см$^3$/см$^2$/шт) | 10 | 10 | 10 |
| Чувствительность, % | — | — | 71 [b] |
| Специфичность, % | 99 | — | — |
| $LOD_{50}$, КОЕ/10 г образца | — | 0,83 (от 0,66 до 1,05) | |

[a] Детская сухая смесь на соевой основе была искусственно заражена *Cronobacter sakazakii. Enterobacter cloaca e* (5 КОЕ/10 г) была внесена только при высоком уровне заражения.
[b] Низкая чувствительность метода обнаружения *Cronobacter* spp. при данном уровне заражения была обусловлена обильным ростом *Enterobacter cloacae*, что затруднило отбор колоний.

Таблица D.3 — Результаты анализа данных, полученных при анализе лактозы

| Рабочие характеристики | Незараженный | Низкий уровень заражения[a] (27 КОЕ/10 г) | Высокий уровень заражения[a] (65 КОЕ/10 г) |
|---|---|---|---|
| Количество участвующих лабораторий | 16 | 16 | 16 |
| Количество лабораторий, отобранных после оценки данных | 16 | 16 | 16 |
| Количество образцов в лаборатории | 8 | 8 | 8 |
| Количество образцов, отобранных после оценки данных | 128 | 128 | 128 |
| Размер образца (г/см$^3$/см$^2$/шт) | 10 | 10 | 10 |
| Чувствительность, % | — | 67 [b] | 100 |
| Специфичность, % | 99 | — | — |
| $LOD_{50}$, КОЕ/10 г образца | — | н/о | |

н/о: не определено
[a] Образцы лактозы были искусственно заражены *Cronobacter turicensis*.
[b] Низкая чувствительность метода обнаружения *Cronobacter* spp. при данном уровне заражения была обусловлена, вероятнее всего, потерей жизнеспособности внесенных бактерий, наблюдавшейся после подготовки образцов.

Таблица D.4 — Результаты анализа данных, полученных при анализе крахмала

| Рабочие характеристики | Незараженный | Низкий уровень заражения[a] (11 КОЕ/10 г) | Высокий уровень заражения[a] (19 КОЕ/10 г) |
|---|---|---|---|
| Количество участвующих лабораторий | 14 | 14 | 14 |
| Количество лабораторий, отобранных после оценки данных | 12 | 12 | 12 |

*Окончание таблицы D.4*

| Рабочие характеристики | Незараженный | Низкий уровень заражения[a] (11 КОЕ/10 г) | Высокий уровень заражения[a] (19 КОЕ/10 г) |
|---|---|---|---|
| Количество образцов в лаборатории | 8 | 8 | 8 |
| Количество образцов, отобранных после оценки данных | 128 | 128 | 128 |
| Размер образца (г/см$^3$/см$^2$/шт) | 10 | 10 | 10 |
| Чувствительность, % | — | — | 65 [b] |
| Специфичность, % | 100 | — | — |
| $LOD_{50}$, КОЕ/10 г образца | — | 0,94 (0,73 до 1,21) | |

[a] Образцы крахмала были искусственно заражены *Cronobacter muytjensii*.
[b] Низкая чувствительность метода обнаружения *Cronobacter* spp. при данном уровне заражения может быть связана с получением более низкого уровня заражения, чем ожидалось в этих образцах.

Таблица D.5 — Результаты анализа данных, полученных при анализе проб окружающей среды

| Рабочие характеристики | Незараженный | Низкий уровень заражения[a] (28 КОЕ/10 г) | Высокий уровень заражения[a] (95 КОЕ/10 г) |
|---|---|---|---|
| Количество участвующих лабораторий | 15 | 15 | 15 |
| Количество лабораторий, отобранных после оценки данных | 10 | 10 | 10 |
| Количество образцов в лаборатории | 8 | 8 | 8 |
| Количество образцов, отобранных после оценки данных | 80 | 80 | 80 |
| Размер образца (г/см$^3$/см$^2$/шт) | Смыв | Смыв | Смыв |
| Чувствительность, % | — | 91 | 99 |
| Специфичность, % | 100 | — | — |
| $LOD_{50}$, КОЕ/образец | — | н/д | |

[a] Образцы окружающей среды (смывы), содержащие естественный контаминант (*Bacillus* spp. на уровне $1{,}0 \cdot 10^6$ КОЕ/г), были искусственно заражены *Cronobacter dublinensis* ssp. d*ublinensis*. Незараженные образцы были загрязнены смесью из *Franconibacter pulveris* и *Franconibacter helveticus*.

**Приложение ДА**
**(справочное)**

## Сведения о соответствии ссылочных международных стандартов межгосударственным стандартам

Таблица ДА.1

| Обозначение ссылочного международного стандарта | Степень соответствия | Обозначение и наименование соответствующего межгосударственного стандарта |
|---|---|---|
| ISO 6887-1:2017 | — | * |
| ISO 6887-2:2017 | — | * |
| ISO 6887-3:2017 | — | * |
| ISO 6887-4:2017 | — | * |
| ISO 6887-5:2010 | — | * |
| ISO 6887-6:2013 | IDT | ГОСТ ISO 6887-6—2015 «Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Подготовка проб для анализа, исходной суспензии и десятичных разведений для микробиологического исследования. Часть 6. Специальные правила приготовления проб, отобранных на начальной стадии производства» |
| ISO 7218 | IDT | ГОСТ ISO 7218—2015 «Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования и рекомендации по микробиологическим исследованиям» |
| ISO 11133 | IDT | ГОСТ ISO 11133—2016 «Микробиология пищевых продуктов, кормов для животных и воды. Приготовление, производство, хранение и определение рабочих характеристик питательных сред» |

* Соответствующий межгосударственный стандарт отсутствует. До его принятия рекомендуется использовать перевод на русский язык данного международного стандарта. Перевод данного международного стандарта находится в Федеральном информационном фонде стандартов.

Примечание — В настоящей таблице использовано следующее условное обозначение степени соответствия стандартов:

- IDT — идентичные стандарты.

## Библиография


[1] ISO 16140 (all parts) Microbiology of the food chain — Method validation

[2] ISO 17468 Microbiology of the food chain — Technical requirements and guidance on establishment or revision of a standardized reference method [Микробиология пищевой цепи — Технических требований и руководства на учреждении или пересмотре стандартизированного справочного метода]

[3] ISO/TS 17728 Microbiology of the food chain — Sampling techniques for microbiological analysis of food and feed samples [Микробиология пищевой цепи. Технические требования и руководство по созданию или пересмотру стандартизированного эталонного метода]

[4] ISO 18593 Microbiology of food and animal feeding stuffs — horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs [Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Горизонтальные методы отбора проб с поверхности с использованием контактных чашек и тампонов на аппликаторах]

[5] Bennour Miled R., Guillier L., Neves S., Augustin J.-C., Colin P., Gnanou Besse N. Individual cell lag time distributions of *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*) and impact of pooling samples on its detection in powdered infant formula. Food Microbiol. 2011, 28 pp. 648—655

[6] Bennour Miled R., Neves S., Baudouin N., Lombard B., Deperrois V., Colin P., Gnanou Besse N. Impact of pooling powdered infant formula samples on bacterial evolution and *Cronobacter* detection. Int. J. Food Microbiol. 2010, 138 pp. 250—259

[7] Farmer J.J. *Enterobacteriaceae*: introduction and identification. In: Manual of Clinical Microbiology, (Murray P.R., Barron E.J., Pfaller M.A., Tenover F.C., Yolken R.H., eds.). ASM Press Inc, Washington, DC, Seventh Edition , 1999, pp. 442—58

[8] Iversen C., Lehner A., Mullane N., Marugg J., Fanning S., Stephan R., Joosten H. The identification of *Cronobacter* spp. (Enterobacter sakazakii). J. Clin. Microbiol. 2007, 45 pp. 3814—3816

[9] Iversen C., Mullane N., Mccardell B., Tall B.D., Lehner A., Fanning S., Stephan R., Joosten H. *Cronobacter* gen. nov., a new genus to accommodate the biogroups of Enterobacter sakazakii, and proposal of *Cronobacter sakazakii* gen. nov. comb. nov., *C. malonaticus* sp. nov., *C. turicensis* sp. nov., *C. muytjensii* sp. nov., *C. dublinensis* sp. nov., *Cronobacter genomospecies* 1, and of three subspecies, *C. dublinensis* sp. nov. subsp. *dublinensis* subsp. nov., *C. dublinensis* sp. nov. subsp. *lausannensis* subsp. nov., and *C. dublinensis* sp. nov. subsp. *lactaridi* subsp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2008, 58 pp. 1442—1447

[10] Iversen C., Druggan P., Schumacher S., Lehner A., Feer C., Gschwend K., Joosten H., Stephan R. Development of a Novel Screening Method for the Isolation of «*Cronobacter*» spp. (*Enterobacter sakazakii*). Appl. Evironm. Microb. 2008, 74 pp. 2550—2553

[11] Joseph S., Cetinkaya E., Drahovska H., Levican A., Figueras M.J., Forsythe S.J. *Cronobacter condimenti* sp. nov., isolated from spiced meat and *Cronobacter universalis* sp. nov., a novel species designation for *Cronobacter* sp. genomospecies, recovered from a leg infection, water, and food ingredients. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2012 June, 62 pp. 1277—1283

[12] Stephan R., Grim C.J., Gopinath G.R., Mammel M.K., Sathyamoorthy V., Trach L.H., Chase H.R., Fanning S., Tall B.D. Re-examination of the taxonomic status of *Enterobacter helveticus, Enterobacter pulveris* and *Enterobacter turicensis* as members of the genus *Cronobacter* and their reclassification in the genera *Franconibacter* gen. nov. and *Siccibacter* gen. nov. as *Franconibacter helveticus* comb. nov., *Franconibacter pulveris* comb. nov. and *Siccibacter turicensis* comb. nov., respectively. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2014, 64 pp. 3402—3410

[13] Stephan R., Van Trappen S., Cleenwerck I., Iversen C., Joosten H., De Vos P., Lehner A. *Enterobacter pulveris* sp. nov. isolated from fruit powder, infant formula and infant formula production environment. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2008, 58 pp. 237—241

[14] Stephan R., Van Trappen S., Cleenwerck I., Vancanneyt M., De Vos P., Lehner A. *Enterobacter turicensis* sp. nov. and *Enterobacter helveticus* sp. nov. isolated from fruit powder. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2007, 57 pp. 820—826

УДК 579.67:006.354 МКС 07.100.30 IDT

Ключевые слова: неселективное обогащение, селективное обогащение, селективно-диагностические среды, хромогенный агар, презумптивные бактерии, *Cronobacter, Cronobacter sakazakii*

Редактор *Л.В. Коретникова*
Технический редактор *И.Е. Черепкова*
Корректор *О.В. Лазарева*
Компьютерная верстка *А.Н. Золотаревой*

Сдано в набор 27.12.2024. Подписано в печать 31.01.2025. Формат 60×84⅛. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 2,79. Уч.-изд. л. 2,37.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

Создано в единичном исполнении в ФГБУ «Институт стандартизации»
для комплектования Федерального информационного фонда стандартов, 117418 Москва, Нахимовский пр-т, д. 31, к. 2.

gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru