

**Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование
Российской Федерации**

**4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ
И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ**

**Метод определения бактерий
Enterobacter Sakazakii в продуктах
для питания детей раннего возраста**

**Методические указания
МУК 4.2.2428—08**

Издание официальное

Москва • 2009

**Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей
и благополучия человека**

**4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ
И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ**

**Метод определения бактерий
Enterobacter Sakazakii в продуктах
для питания детей раннего возраста**

**Методические указания
МУК 4.2.2428—08**

ББК 51.28
M54

M54 Метод определения бактерий Enterobacter Sakazakii в продуктах для питания детей раннего возраста: Методические указания.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009.—19 с.

ISBN 5—7508—0764—9

1. Разработаны Государственным учреждением «Научно-исследовательский институт питания» Российской Академии медицинских наук (В. А. Тутельян, С. А. Шевелева, И. Я. Конь, Н. Р. Ефимочкина, И. Б. Быкова, С. Ю. Батищева).

2. Рекомендованы к утверждению Комиссией по государственному санитарно-эпидемиологическому нормированию при Федеральной службе по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

3. Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г. Г. Онищенко 29 октября 2008 г.

4. Введены в действие с 15 декабря 2008 г.

5. Введены впервые

ББК 51.28

ISBN 5—7508—0764—9

**© Роспотребнадзор, 2009
© Федеральный центр гигиены и
эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009**

Содержание

1. Общие положения и область применения.....	4
2. Сущность метода.....	6
3. Аппаратура, материалы, лабораторная посуда, реактивы и питательные среды	8
3.1. Аппаратура и инструментарий	8
3.2. Лабораторная посуда и материалы.....	9
3.3. Реактивы и питательные среды	10
4. Подготовка к анализу.....	12
4.1. Приготовление растворов и реагентов	12
4.2. Приготовление питательных сред.....	12
5. Отбор и подготовка проб к анализу.....	13
6. Проведение анализа	14
7. Подтверждение принадлежности выделенных культур к <i>Enterobacter sakazakii</i>	15
8. Учет результатов	15
9. Требования безопасности	17
10. Нормативные ссылки.....	17
<i>Приложение 1. Таблица для расчета наиболее вероятного числа микроорганизмов</i>	18

УТВЕРЖДАЮ

Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации

Г. Г. Онищенко

29 октября 2008 г.

Дата введения: 15 декабря 2008 г.

**4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ.
БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ**

**Метод определения бактерий *Enterobacter Sakazakii*
в продуктах для питания детей раннего возраста**

**Методические указания
МУК 4.2.2428—08**

1. Общие положения и область применения

1.1. Настоящие методические указания устанавливают порядок контроля и методы определения бактерий *Enterobacter sakazakii* – возбудителей пищевых токсицинфекций у детей раннего возраста, при осуществлении государственного санитарно-эпидемиологического надзора, а также при санитарно-эпидемиологическом расследовании вспышек пищевых отравлений и инфекций с пищевым путем передачи.

1.2. Методические указания предназначены для органов и организаций Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, осуществляющих контроль качества и безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов, в т. ч. импортируемых в Российскую Федерацию, а также лабораторную диагностику заболеваний с пищевым путем передачи. Методические указания могут быть использованы другими лабораторными центрами, осуществляющими контроль качества и безопасности пищевых продуктов и аккредитованными в установленном порядке.

1.3. Контролю на наличие бактерий *E. sakazakii* подлежат детские молочные смеси и продукты прикорма сухие, а также специализированные продукты для лечебного и профилактического питания детей

первого года жизни, при анализе которых на наличие патогенных микроорганизмов, в т. ч. сальмонелл, не были выявлены облигатные патофаги, принадлежащие к родам *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, группам энтеровирулентных *Escherichia coli*, но выявлялся рост сопутствующей грамотрицательной неспорообразующей микрофлоры.

1.4. Необходимость контроля указанных групп продукции на наличие *E. sakazakii* обусловлена регистрацией в последние годы документированных спорадических случаев и вспышек септических инфекций и некротизирующего энтероколита у детей I года жизни, в первую очередь недоношенных, новорождённых с низкой массой тела или иммунокомпетентных. Все случаи заболеваний связаны с употреблением детских молочных смесей, контаминированных *E. sakazakii*, в т. ч. при очень низких уровнях возбудителя (1—10 КОЕ/г). При этом установлено, что в первую очередь *E. sakazakii* может попадать в сухие молочные смеси с контаминированными ингредиентами, добавляемыми после сушки, или из окружающей среды в процессе упаковки готового продукта.

1.5. Предлагаемый метод определения бактерий *E. sakazakii* в пищевых продуктах, предназначенных для детей раннего возраста, предусматривает определение наличия или отсутствия указанных микроорганизмов в определенной массе (объеме) продукта в соответствии с нормативами СанПиН 2.3.2.1078—01 «Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов», выраженными в альтернативной форме и основанными на существующей системе отбора образцов и оценки результатов анализа по двухклассной системе. Настоящие методические указания также предусматривают определение количества *E. sakazakii* в пищевых продуктах для детей раннего возраста методом наиболее вероятного числа (НВЧ).

1.6. Обнаружение *E. sakazakii* в 300 г инстантных молочных смесей и продуктов прикорма сухих, предназначенных для детей 1 года жизни, или в 300 г сухих молочных смесей или специализированных продуктов для детей младше 6 месяцев, должно рассматриваться как присутствие патогенных бактерий в исследуемых образцах, свидетельствующее о высокой степени риска для детей данной возрастной категории, и служить основанием для запрета использования такой продукции с принятием соответствующих мер, направленных на обеспечение безопасности продуктов детского питания.

2. Сущность метода

2.1. Метод определения бактерий *Enterobacter sakazakii* основан на высеивании определенных количеств продукта в жидкие селективные среды для выделения бактерий семейства *Enterobacteriaceae* с последующим пересевом на поверхность твердых селективных сред, инкубированием посевов, выявлении в этих посевах бактерий, способных расти и образовывать типичные колонии на поверхности селективного агара, с последующим выделением чистой культуры. Ниже представлена методическая схема определения *E. sakazakii*.

Таблица 1

Схема исследования сухих детских смесей на наличие *E. sakazakii*

Этап	Продолжительность инкубации, ч	Температура, °C
1. Подготовка реагентов и материалов		
2. Растворение навесок в стерильном фосфатном буфере (ФБР) в соотношении 1 : 10 (при необходимости определения количества – навесок массой 100, 10 и 1 г в 3 колбы или пробирки с ФБР каждая), смешивание и инкубация	18—24	36
3. Посев проинкубированной суспензии в селективный питательный бульон для выделения бактерий семейства <i>Enterobacteriaceae</i> и инкубация	18-24	36
4. Пересев 0,1 мл проинкубированного бульона для выделения <i>Enterobacteriaceae</i> на поверхность фиолетово-красного желчного агара с глюкозой (VRBG agar) или агар Эндо	18—24	36
5. Отбор 5 подозрительных на <i>E. sakazakii</i> колоний с поверхности VRBG агара или Эндо, пересев на триптон-соевый агар с дрожжевым экстрактом (TSYEA) и инкубация	48—72	25
6. Отбор колоний с желтым пигментом, микроскопия по Граму и подтверждение их видовой принадлежности		
7. При необходимости – подсчет наиболее вероятного числа (НВЧ) по количеству положительных проб в каждой из засеянных навесок продукта		

2.2. Идентификация чистых культур проводится по совокупности морфологических, биохимических и других признаков, определяющих принадлежность к виду *E. sakazakii*. Подтверждение принадлежности к *E. sakazakii* производится путем получения развернутых биохимических характеристик штаммов. Допускается использование тест-систем для биохимической дифференциации энтеробактерий API 20E, Rapid 20E, ID 32E (ф. «БиоМерье», Франция) и др.

Определение биохимических характеристик, дифференцирующих *E. sakazakii* от близкородственных представителей энтеробактерий *Enterobacter cloacae* и *Pantoea agglomerans*, приведены в табл. 2.

Таблица 2

Биохимическая дифференциация *Enterobacter sakazakii*

Тест или субстрат	Реакции		
	<i>E. sakazakii</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>P. agglomerans</i>
Лизиндекарбоксилаза	—	—	—
Аргининдигидролаза	+	+	—
Орнитиндекарбоксилаза	+	+	(—)
Подвижность	+	+	(+)
Утилизация цитратов	+	+	+
Реакция с метиловым красным	—	—	—
Реакция Фогес–Проскауэра	+	+	(+)
Индол	—	—	(—)
Глюкоза	+	+	+
Лактоза	+	+	(+)
Сахароза	+	+	(+)
Дульцит	—	—	(—)
Адонит	—	(—)	—
Раффиноза	(+)	+	(+)
D-сорбит	—	+	(+)
α-метил-D-глюкозид	+	(+)	—
мальтоза	+	+	+
Маннит	+	+	+
Разжижение желатины (22 °C)	—	—	+
Мукоидный рост	+	+	+
Желтый пигмент при 24 °C	+	—	(+)

Примечания:

«+» – 90—100 % штаммов положительные; «(+)» – 21—89 % штаммов положительные;

«—» – 0—9 % штаммов положительные; «(−)» – 10—24 % штаммов положительные.

Ведущими дифференциирующими признаками *Enterobacter sakazakii* от других представителей вида *Enterobacter* являются способность к образованию желтого пигмента при культивировании на неселективных средах при оптимальной температуре 25 °С и отсутствие ферментации D-сорбита. Для дифференциации *E. sakazakii* от сорбитарабельных и обладающих желтым пигментом представителей рода *Pantoea agglomerans* (Syn: *Erwinia spp.*) используется тест разжижения желатины.

В качестве дополнительного теста при идентификации *E. sakazakii* возможно определение α -глюкозидазной активности на хромогенных средах, содержащих 4-нитрофенил- α -D-глюкопиранозид или 5-бromo-4-хлоро-3-индолил- α ,D-глюкопиранозид.

3. Аппаратура, материалы, лабораторная посуда, реагенты и питательные среды

3.1. Аппаратура и инструментарий

Анализатор потенциометрический, погрешность измерений pH ± 0,01	ГОСТ 19881—74
Шкаф сушильный стерилизационный ШСС-80П или других марок, позволяющий поддерживать температуру (160 ± 5) °С	ТУ 64-1-28-70—76
Термостат, позволяющий поддерживать рабочую температуру 37 °С с отклонением от заданной ± 1 °С	ТУ 64-1-1382—83
Термостат, позволяющий поддерживать рабочую температуру 41,5 °С с отклонением от заданной ± 1 °С	ТУ 64-1-1382—83
Весы лабораторные общего назначения, 2 и 4 класса точности, с наибольшим пределом взвешивания 200 г	ГОСТ 24104—88
Микроскоп биологический МБИ-1, МБИ-2, МБИ-3, МБР-1, МБР-3, МБС	ГОСТ 8284—78
Стерилизаторы паровые медицинские или аналогичные	ГОСТ 19569-89Е
Дистиллятор, обеспечивающий качество дистиллированной воды в соответствии с Гомогенизатор перистальтического типа «Микс-2», «Стомайкер» или других наименований	ГОСТ 6709—72
	AES Lab., Cat № AESAP 1066

Гомогенизатор типа «вортекс»
Микролипетки на 200—1 000 мкл

Облучатель бактерицидный настенный
ОБН-150 или других видов
Холодильник бытовой электрический
Пинцет медицинский
Ножницы медицинские
Скальпель хирургический, 15 см
Часы механические сигнальные
Электроплитка
Аппарат универсальный для встряхивания
жидкости в колбах и пробирках (или другая
аппаратура для встряхивания)

ВИОНІТ, Cat. № 720040
или «Ленпипет»

ТУ-16-535—84
ГОСТ 16317—87
ГОСТ 21241—89
ГОСТ 21239—89
ГОСТ 21240—89
ГОСТ 3145—84
ГОСТ 14919—83

ТУ 64-1-2451—78

3.2. Лабораторная посуда и материалы

Бумага фильтровальная лабораторная
Марля медицинская
Колбы плоскодонные конические или
круглые разной вместимости
Воронки стеклянные
Вата медицинская гигроскопическая
Пипетки вместимостью 1, 2, 5 и 10 см³
Пробирки типов П1, П2
Стекла предметные для микропрепараторов
Спиртовки лабораторные стеклянные
Термометр ртутный с диапазоном измерения
от 0 до 100 °C (цена деления шкалы 1 °C)
Чашки биологические (Петри) или
одноразовые из полимерных материалов
Пакеты стерильные для гомогенизатора
Отраслевой стандарт для визуальной оценки
мутности № 10
Денситометр для бактериальных суспензий
типа «Densi-La-Meter» или «Денсимат»
Стандарт Макфарланда № 1, 2, 3
Петля бактериологическая

ГОСТ 12026—76
ГОСТ 9412—77

ГОСТ 1770—74
ГОСТ 25336—82
ГОСТ 5556—81
ГОСТ 29227—91
ГОСТ 25336—82
ГОСТ 6672—75
ГОСТ 23932—90

ГОСТ 13646—68

ГОСТ 23932—90
AES Lab., Cat. № AES400/50G

ГИСК им. Л. А. Тарасевича
ф. «Лахема», «BioMerieux»
ф. «BioMerieux»

3.3. Реактивы и питательные среды

Агар микробиологический	ГОСТ 17206—84
Вода дистиллированная	ГОСТ 6709—72
D-глюкоза, ч	ГОСТ 6038—79
D-лактоза, 1-водная	ТУ 6-09-22-98—79
Маннит	
D-сорбит	
Рамноза	
Калия гидроокись	ГОСТ 24363—80
Калий фосфорно-кислый однозамещенный, ч	ГОСТ 4198—75
Калий фосфорно-кислый двузамещенный 3-водный	ГОСТ 2493—75
Кислота соляная, хч	ГОСТ 3118—77
Литий хлористый, ч или хч, или чда	ГОСТ 4328—77
Масло иммерсионное для микроскопии	ГОСТ 31739—78
Набор реактивов для окраски по Граму	
Натрий-аммоний фосфорно-кислый двузамещенный, 4-водный, ч или хч	ГОСТ 4170—78
Натрия гидроокись, чда	ГОСТ 4328—77
Натрий лимонно-кислый, 5,5-водный, чда	ГОСТ 22280—75
Натрий хлористый, ч или хч, или чда	ГОСТ 4233—77
Пара-диметиламинонбензальдегид, ч	ТУ 6-09-3272—77
Пептон сухой ферментативный для бактериологических целей	ГОСТ 13805—76
Спирт этиловый ректифицированный технический	ГОСТ 18300—87
Спирт этиловый ректифицированный	ГОСТ 5962—67
Феноловый красный	ГОСТ 5853—51
Фенолфталеин	ГОСТ 5850—72
Фуксин основной	ТУ 6-09-4119—75
Хлороформ технический	ГОСТ 2-15-76—72
Уксусная кислота	ГОСТ 61—75
Сульфаниловая кислота	
α-Нафтол	
Цинк порошкообразный	ГОСТ 3640
Желатин сухой	
Экстракт дрожжевой сухой	

Тест-штамм *Enterobacter sakazakii*, типичный по культуральным, морфологическим и биохимическим свойствам

Пептонная вода забуференная (сухая)

Триптофальный ГРМ-агар и ГРМ-бульон

Питательный бульон и питательный агар

Триптофальный агар с дрожжевым экстрактом (TSYEA)

Триптофальный бульон с дрожжевым экстрактом (TSYEB)

Среды Гисса с глюкозой, лактозой, маннитом, рамнозой, дульцитом, адонитом, сахарозой, сорбитом

ГИСК им. Л. А. Тарасевича

ФС 42-3377—97 (ГНЦПМ)

ТУ 10-02-02-789-176—94

HiMedia M1214

HiMedia M1263

ФС (ЦНИИВС им. И. И. Мечникова, НИИ питательных сред)

Difco

ТУ 9229-072-00419785

ТУ 9229-072-00419785

ГОСТ 30519—97

ГОСТ 30519—97

ГОСТ 30519—97

SIM-агар (сероводород-индол-подвижность)

Среда Эндо

Агар желчный фиолетово-красный

Среда Кесслер с глюкозой

Бульон Мак-Конки с глюкозой

Бульон с желчью, бриллиантовым зеленым и глюкозой

Тест-системы биохимические для видовой идентификации API 20E, Rapid 20E, ID 32E,

для идентификации *Enterobacteriaceae*

и других грамотрицательных палочек

Набор реактивов для окраски по Граму

Набор для постановки оксидазного теста

BioMerieux

Примечание. Допускается использование других питательных сред и диагностических препаратов с аналогичными характеристиками, прошедших регистрацию в РФ в установленном порядке, после процедуры их стандартизации относительно официально утвержденных методов анализа.

Питательные среды и биологические препараты зарубежного производства должны иметь международный сертификат качества ИСО 9000 или EN 29 000. Питательные среды и препараты отечественного производства должны вырабатываться по нормативной документации, утвержденной в установленном порядке.

4. Подготовка к анализу

4.1. Приготовление растворов и реагентов

4.1.1. Пептонно-солевой раствор	По ГОСТ 26669—85
4.1.2. Изотонический (0,85 %-й водный) раствор хлорида натрия	По ГОСТ 26669—85
4.1.3. Приготовление растворов и реагентов для окраски препаратов по Граму	По ГОСТ 10444.1 или в соответствии с инструкцией по применению
4.1.4. Стерильный фосфатный буфер с $\text{pH } 7,2 \pm 0,1$	$\text{KH}_2\text{PO}_4 - 0,45 \text{ г}, \text{Na}_2\text{HPO}_4 - 5,34 \text{ г}$ в $1\ 000 \text{ см}^3$ дистиллированной H_2O , стерилизовать при температуре 121°C в течение 30 мин

4.2. Приготовление питательных сред

4.2.1. Среды промышленного изготовления, поименованные в п. 3.3, готовят согласно прописям на этикетке или в соответствии с рекомендациями фирмы-изготовителя.

4.2.2. *Питательный агар с 5 % глюкозы* готовят в соответствии с ГОСТ 10444.1—84 «Консервы. Приготовление растворов, красок, индикаторов, питательных сред, применяемых в микробиологическом анализе».

4.2.3. *Триптон-соевый бульон с дрожжевым экстрактом, триптон-соевый агар с дрожжевым экстрактом.*

Состав сред (г/л): ферментативный гидролизат казеина – 17,0; пептон соевый – 3,0; натрий хлористый – 5,0; фосфат калия однозамещенный – 2,5; глюкоза – 2,5; дрожжевой экстракт – 6,0; агар микробиологический (для TSYEA) – 15,0.

Компоненты растворяют в $1\ 000 \text{ см}^3$ дистиллированной воды, тщательно перемешивают, устанавливают $\text{pH } 7,3 \pm 0,2$ и автоклавируют при 121°C в течение 15 мин.

Готовые среды разливают в стерильные колбы или пробирки и хранят в защищенных от света условиях при температуре не выше 8°C .

4.2.4. *Среда для определения подвижности:* 20 г гидролизата казеина ферментативного, 6 г пептона мясного ферментативного и 5 г агара растворяют в $1\ 000 \text{ см}^3$ дистиллированной воды, устанавливают $\text{pH } 7,3 \pm 0,2$, разливают в пробирки по $5—7 \text{ см}^3$ и стерилизуют при 121°C в течение 15 мин.

4.2.5. *Среды Гисса с углеводами:* 10 г пептона ферментативного и 5 г натрия хлористого растворяют в $1\ 000 \text{ см}^3$ дистиллированной воды и

добавляют 10 г соответствующего углевода. Устанавливают pH $7,1 \pm 0,1$, вносят 10 мл индикатора Андреде (также возможно использование индикатора бромкрезолового пурпурного, «ВР» и др.), разливают в пробирки и стерилизуют при 112 °С в течение 20 мин.

5. Отбор и подготовка проб к анализу

5.1. Отбор и подготовку проб продукции производят в соответствии с ГОСТ 26668—85 «Методы отбора проб для микробиологических анализов», ГОСТ 26669—85 «Продукты пищевые и вкусовые. Подготовка проб для микробиологических анализов», МУК 4.2.577—96 «Методы микробиологического контроля продуктов детского, лечебного питания и их компонентов», ГОСТ Р 51446—99 (ИСО 7218—96). Масса или объем отбираемых проб должны быть достаточными для проведения исследования на патогенные микроорганизмы и минимально вдвое превышать аналитический образец.

5.2. От продукции в потребительской таре пробы отбирают в количестве одной или нескольких единиц в зависимости от массы или объема потребительской тары, с тем чтобы количество было достаточным для проведения анализа. От продукции в транспортной или потребительской таре больших размеров (или неупакованной) пробы отбирают из разных мест с различной глубины, включая поверхность.

5.3. Для микробиологических анализов пробы отбирают до взятия проб на физико-химические и органолептические анализы стерильным инструментом в стерильную посуду.

5.4. Первичный посев исследуемых проб продуктов на патогенные микроорганизмы проводят в соответствии с порядком, изложенным в МУК 4.2.577—96 «Методы микробиологического контроля продуктов детского, лечебного питания и их компонентов».

5.5. При отсутствии роста облигатных патогенов, принадлежащих к родам *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, группам энтеровирулентных *Escherichia coli*, но при обнаружении роста сопутствующей грамотрицательной неспорообразующей микрофлоры в нормируемых навесках исследуемых продуктов, от них отбирают дополнительные пробы (2 навески по 100 г при первичном посеве 100 г продукта, 2 навески по 125 г при первичном посеве 50 г, 2 навески по 137,5 г при первичном посеве 25 г) и анализируют в соответствии с процедурой, изложенной в разделе 6.

6. Проведение анализа

6.1. Пробы продуктов массой 100, 125 или 137,5 г вносят в фосфатный буферный раствор (ФБР) или изотонический раствор (п. 3.3) в соотношении 1 : 9 по объему. Посевы термостатируют при температуре (37 ± 1) °С в течение (22 ± 2) ч.

6.2. При количественном анализе общая масса (объем) навески должна быть не менее 400 г (см^3).

Из подготовленной по п. 5 пробы для анализа отбирают 4 навески (порции) продукта массой 100 г (см^3) каждая. Производят посев каждой из трех навесок (порций) в 900 см^3 ФБР и перемешивают.

Из четвертой навески (порции) массой (объемом) 100 г (см^3) отбирают три навески (порции) продукта массой 10 г (см^3) и производят посев в 90 см^3 ФБР, перемешивают. Из этой же пробы отбирают три навески (порции) продукта массой 1 г (см^3) и производят посев в 9 см^3 ФБР. Для посева (при необходимости – предполагаемом высоком содержании *E. sakazakii* в продукте) меньших количеств продукта – 0,1; 0,01 г – делают десятикратно убывающие разведения навески массой 10 г и вносят по 1 см^3 (х 3) соответствующих разведений в 9 см^3 ФБР.

6.2.1. После термостатирования проб продукта в среде для первичного накопления 10 см^3 суспензии (1 см^3 – при первичном засеве 1 г или 1 см^3) пересевают в 90 см^3 (9 см^3) жидких селективных сред для выделения бактерий семейства *Enterobacteriaceae* по ГОСТ 30519—97 – среду Кесслера с глюкозой или глюкозный бульон с бриллиантовым зеленым и желчью, или бульон Мак-Конки. Посевы термостатируют при температуре (37 ± 1) °С в течение (22 ± 2) ч.

6.2.2. Из посевов после термостатирования, независимо от наличия или отсутствия признаков роста, делают пересев штрихом на поверхность чашек Петри с одной из агаризованных дифференциально-диагностических сред по п. 3.3. Допускается проводить пересев петлей штрихом. Чашки со средами предварительно подсушивают.

Посевы термостатируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 24 ч.

6.2.3. При отсутствии роста на чашках с дифференциально-диагностическими средами типа агара Эндо или агара желчного фиолетово-красного анализ прекращают и дают заключение об отсутствии *E. sakazakii* в исследованной пробе.

6.3. При обнаружении на чашках лактозоположительных колоний дальнейшему изучению подвергают все обнаруженные варианты, для

чего отбирают по 3—5 колоний каждого типа для их дальнейшего изучения.

6.4. Отобранные для исследования 3—5 характерных колоний пересевают на поверхность триптон-соевого агара с дрожжевым экстрактом по п. 3.3 и термостатируют при температуре 25 °С в течение 72 ч. В качестве положительного контроля используют референс-штамм *E. sakazakii*, типичный по фенотипическим свойствам.

6.5. Культуры, растущие на триптон-соевом агаре с образованием желтого или желто-коричневого пигмента, подвергают дальнейшему изучению для подтверждения принадлежности к *Enterobacter sakazakii*.

7. Подтверждение принадлежности выделенных культур к *Enterobacter sakazakii*

7.1. Подтверждение принадлежности выделенных культур проводят с применением тест-систем для биохимической идентификации API 20E, Rapid 20E, ID 32E.

7.2. К бактериям *Enterobacter sakazakii* относят культуры, имеющие характерные признаки роста на дифференциально-диагностических средах, при микроскопии по Граму окрашенные отрицательно, подвижные, оксидазоотрицательные, соответствующие комплексу признаков, указанных в табл. 2, имеющие желтый пигмент, не ферментирующие сорбит и не разжижающие желатину. Бактерии *E. sakazakii* обладают α-глюказидазной активностью.

8. Учет результатов

8.1. Результаты оценивают по каждой исследованной пробе отдельно.

8.2. При получении положительного результата подтверждающего анализа дают заключение о выявлении *E. sakazakii* в исследованной навеске (объеме) продукта.

При получении отрицательного результата дают заключение об отсутствии *E. sakazakii* в исследованной навеске (объеме) продукта.

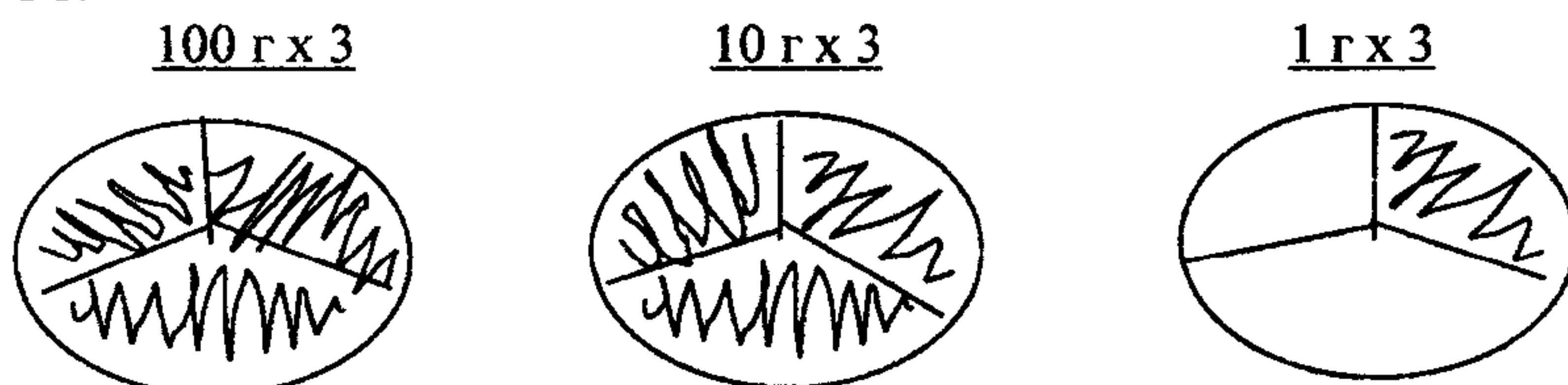
8.3. Учет результатов при количественном определении.

Результат оценивают по каждой исследованной пробе продукта отдельно. Регистрируют число положительных результатов в колбах и пробирках с посевами трех последовательно убывающих масс (объемов) продукта, в которых подтверждено наличие бактерий *E. sakazakii* при пересеве на твердые питательные среды и последующей идентификации. В зависимости от получаемой комбинации положительных и отрицательных результатов для каждого значения массы (объема) продукта

составляют трехзначное число (индекс), по которому, используя таблицу, приведенную в приложении, находят наиболее вероятное число (НВЧ) бактерий *E. sakazakii*, соответствующее их содержанию в 1 г (см³) продукта.

Для окончательного определения НВЧ бактерий *E. sakazakii* в анализируемом образце учитывают значение первой выбранной для расчета индекса НВЧ массы (объема) продукта с подтвержденным наличием *E. sakazakii*. Так, в случае если расчет ведется от посева массы (объема) 100 г (см³) (х 3) продукта, количество *E. sakazakii* в 1 г (см³) образца рассчитывается путем деления числа НВЧ, взятого из таблицы соответственно установленному индексу, на 100. В случае, когда в качестве первого значения для расчета выбрана масса (объем) 10 г (х 3), количество *E. sakazakii* в 1 г (см³) образца рассчитывается путем деления числа НВЧ из таблицы на 10.

Пример: Бактерии *E. sakazakii* обнаружены в трех повторностях при посеве 100 г, в трех повторностях при посеве 10 г и в одной – при посеве 1 г.



Обозначения: рост *E. sakazakii*.

Результат по числу секторов с подтвержденным ростом бактерий *E. sakazakii* из трех выбранных масс записывается как индекс 3 : 3 : 1, что соответствует НВЧ, равному 46 (см. приложение). Соответственно, наиболее вероятное число бактерий *E. sakazakii* составляет 0,46 КОЕ в 1 г продукта.

Если значение НВЧ по таблице составляет величину более чем 110 КОЕ (индекс 3 : 3 : 3), исследование целесообразно повторить, используя более высокие разведения образца, в которых исходная концентрация продукта будет в 10 или 100 раз ниже, чем в первоначально выбранном значении.

9. Требования безопасности

Исследования пищевых продуктов на наличие *Enterobacter sakazakii* проводят в соответствии с СанПиН 1.2.731—99 «Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности и гельминтами».

10. Нормативные ссылки

10.1. ГОСТ 30519—97 «Продукты пищевые. Метод выявления бактерий семейства Enterobacteriaceae».

10.2. ГОСТ Р 51446—99 (ИСО 7218—96) «Микробиология. Продукты пищевые. Общие правила микробиологических исследований».

10.3. ГОСТ 26668—85 «Продукты пищевые и вкусовые. Методы отбора проб для микробиологических исследований».

10.4. ГОСТ 26669—85 «Продукты пищевые и вкусовые. Подготовка проб для микробиологических анализов».

10.5. ГОСТ 26670—91 «Продукты пищевые. Методы культивирования микроорганизмов».

10.6. ГОСТ 10444.1—84 «Консервы. Приготовление растворов, красок, индикаторов, питательных сред, применяемых в микробиологическом анализе».

10.7. СанПиН 2.3.2.1078—01 «Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов».

10.8. СанПиН 1.2.731—99 «Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности и гельминтами».

10.9. МУК 4.2.577—96 «Методы микробиологического контроля продуктов детского, лечебного питания и их компонентов».

Приложение

Таблица для расчета наиболее вероятного числа микроорганизмов

Число секторов с подтвержденным ростом <i>E. sakazakii</i> (из трех выбранных значений массы (объема))			НВЧ КОЕ/Г, см ³	Действительное число микроорганизмов в 1 г (см ³) с вероятностью, %				
1,0	0,1	0,01		95		99		
				от	до	от	до	
1	2	3	4	5	6	7	8	
0	0	0	< 0,30	0,00	0,94	0,00	1,40	
0	0	1	0,30	0,01	0,95	0,00	1,40	
0	1	0	0,30	0,01	1,00	0,00	1,60	
0	1	1	0,61	0,12	1,70	0,05	2,50	
0	2	0	0,62	0,12	1,70	0,05	2,50	
0	3	0	0,94	0,35	3,30	0,18	4,60	
1	0	0	0,36	0,02	1,70	0,05	2,50	
1	0	1	0,72	0,12	1,70	0,05	2,50	
1	0	2	1,10	0,40	3,50	0,20	4,60	
1	1	0	0,74	0,13	2,00	0,06	2,70	
1	1	1	1,10	0,40	3,50	0,20	4,60	
1	2	0	1,10	0,40	3,50	0,20	4,60	
1	2	1	1,50	0,50	3,80	0,20	5,20	
1	3	0	1,60	0,50	3,80	0,20	5,20	
2	0	0	0,92	0,15	3,50	0,07	4,60	
2	0	1	1,40	0,40	3,50	0,20	4,60	
2	0	2	2,00	0,50	3,80	0,20	5,20	
2	1	0	1,50	0,40	3,80	0,20	5,20	
2	1	1	2,00	0,50	3,80	0,20	5,20	
2	1	2	2,00	0,50	3,80	0,20	5,20	
2	2	0	2,70	0,90	9,40	0,50	14,20	
2	2	1	2,10	0,50	4,00	0,20	5,60	
2	2	2	2,80	0,90	9,40	0,50	14,20	
2	3	0	3,50	0,90	9,40	0,50	14,20	
2	3	1	3,60	0,90	9,40	0,50	14,20	
3	0	0	2,30	0,50	9,40	0,30	14,20	
3	0	1	3,80	0,90	10,40	0,50	15,70	

Продолжение

1	2	3	4	5	6	7	8
3	0	2	6,40	1,60	18,10	1,00	25,00
3	1	0	4,30	0,90	18,10	0,50	25,00
3	1	1	7,50	1,70	19,90	1,10	27,00
3	1	2	12,00	3,00	36,00	2,00	44,00
3	1	3	16,00	3,00	38,00	2,00	52,00
3	2	0	9,30	1,80	36,00	1,20	43,00
3	2	1	15,00	3,00	38,00	2,00	52,00
3	2	2	21,00	3,00	40,00	2,00	56,00
3	2	3	29,00	9,00	99,00	5,00	152,00
3	3	0	24,00	4,00	99,00	5,00	152,00
3	3	1	46,00	9,00	198,00	5,00	283,00
3	3	2	110,00	20,00	400,00	10,00	570,00
3	3	3	> 110,00				

**Метод определения бактерий
Enterobacter Sakazakii в продуктах
для питания детей раннего возраста**

**Методические указания
МУК 4.2.2428—08**

**Редакторы Н. Е. Акопова, Н. В. Кожока
Технический редактор Г. И. Климова**

Подписано в печать 25.03.09

Формат 60x88/16

Печ. л. 1,25

Тираж 500 экз.

Заказ 22

**Федеральная служба по надзору
в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
127994, Москва, Вадковский пер., д. 18/20**

**Оригинал-макет подготовлен к печати и тиражирован
отделом издательского обеспечения
Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора
117105, Москва, Варшавское ш., 19а
Отделение реализации, тел./факс 952-50-89**