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

gost.e-ecolog.ru

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
М54

М54 **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 реактивов ... 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 *Enterobacter sakazakii* ... 15
8. Учет результатов ... 15
9. Требования безопасности ... 17
10. Нормативные ссылки ... 17
Приложение 1. Таблица для расчета наиболее вероятного числа микроорганизмов ... 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 токсикоинфекций 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 патогены, 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 иммунокомпромиссных. 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 высеве определенных количеств продукта в жидкие селективные среды для выделения бактерий семейства *Enterobacteriaceae* с последующим пересевом на поверхность твердых селективных сред, инкубировании 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, °С
1. Подготовка реактивов 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 *Enterobacteriaceae* и инкубация	18-24	36
4. Пересев 0,1 мл проинкубированного бульона для выделения *Enterobacteriaceae* на поверхность фиолетово-красного желчного агара с глюкозой (VRBG agar) или агар Эндо	18—24	36
5. Отбор 5 подозрительных на *E. sakazakii* 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		
	E. sakazakii	*E. cloacae*	*P. agglomerans*
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 °С)	–	–	+
Мукоидный рост	+	+	+
Желтый пигмент при 24 °С	+	–	(+)

Примечания:

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

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

Ведущими дифференцирующими 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 сорбитвариабельных 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-бромо-4-хлоро-3-индолил- α,d-глюкопиранозид.

3. Аппаратура, материалы, лабораторная посуда, реактивы 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	ГОСТ 6709—72
Гомогенизатор перистальтического типа «Микс-2», «Стомайкер» или других наименований	AES Lab., Cat № AESAP 1066

Гомогенизатор типа «вортекс»	
Микропипетки на 200—1 000 мкл	BIOHIT, Cat. № 720040 или «Ленпипет»
Облучатель бактерицидный настенный ОБН-150 или других видов	ТУ-16-535—84
Холодильник бытовой электрический	ГОСТ 16317—87
Пинцет медицинский	ГОСТ 21241—89
Ножницы медицинские	ГОСТ 21239—89
Скальпель хирургический, 15 см	ГОСТ 21240—89
Часы механические сигнальные	ГОСТ 3145—84
Электроплитка	ГОСТ 14919—83
Аппарат универсальный для встряхивания жидкости в колбах и пробирках (или другая аппаратура для встряхивания)	ТУ 64-1-2451—78

3.2. Лабораторная посуда и материалы

Бумага фильтровальная лабораторная	ГОСТ 12026—76
Марля медицинская	ГОСТ 9412—77
Колбы плоскодонные конические или круглые разной вместимости	ГОСТ 1770—74
Воронки стеклянные	ГОСТ 25336—82
Вата медицинская гигроскопическая	ГОСТ 5556—81
Пипетки вместимостью 1, 2, 5 и 10 $см^3$	ГОСТ 29227—91
Пробирки типов П1, П2	ГОСТ 25336—82
Стекла предметные для микропрепаратов	ГОСТ 6672—75
Спиртовки лабораторные стеклянные	ГОСТ 23932—90
Термометр ртутный с диапазоном измерения от 0 до 100 °С (цена деления шкалы 1 °С)	ГОСТ 13646—68
Чашки биологические (Петри) или одноразовые из полимерных материалов	ГОСТ 23932—90
Пакеты стерильные для гомогенизатора	AES Lab., Cat. № AES400/50G
Отраслевой стандарт для визуальной оценки мутности № 10	ГИСК им. Л. А. Тарасевича
Денситометр для бактериальных суспензий типа «Densi-La-Meter» или «Денсимат»	ф. «Лахема», «BioMerieux»
Стандарт Макфарланда № 1, 2, 3	ф. «BioMerieux»
Петля бактериологическая	

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-диметиламинобензальдегид, ч	ТУ 6-09-3272—77
Пептон сухой ферментативный для бактериологических целей	ГОСТ 13805—76
Спирт этиловый ректификованный технический	ГОСТ 18300—87
Спирт этиловый ректификованный	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	ГИСК им. Л. А. Тарасевича
Пептонная вода забуференная (сухая)	
Триптозный ГРМ-агар и ГРМ-бульон	ФС 42-3377—97 (ГНЦПМ)
Питательный бульон и питательный агар	ТУ 10-02-02-789-176—94
Триптон-соевый агар с дрожжевым экстрактом (TSYEA)	HiMedia M1214
Триптон-соевый бульон с дрожжевым экстрактом (TSYEB)	HiMedia M1263
Среды Гисса с глюкозой, лактозой, маннитом, рамнозой, дульцитом, адонитом, сахарозой, сорбитом	ФС (ЦНИИВС им. И. И. Мечникова, НИИ питательных сред)
SIM-агар (сероводород-индол-подвижность)	Difco
Среда Эндо	ТУ 9229-072-00419785
Агар желчный фиолетово-красный	ТУ 9229-072-00419785
Среда Кесслер с глюкозой	ГОСТ 30519—97
Бульон Мак-Конки с глюкозой	ГОСТ 30519—97
Бульон с желчью, бриллиантовым зеленым и глюкозой	ГОСТ 30519—97
Тест-системы биохимические для видовой идентификации API 20E, Rapid 20E, ID 32E, для идентификации Enterobacteriaceae и других грамотрицательных палочек	BioMerieux
Набор реактивов для окраски по Граму	
Набор для постановки оксидазного теста	

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 реактивов

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 реактивов для окраски препаратов по Граму	По ГОСТ 10444.1 или в соответствии с инструкцией по применению
4.1.4. Стерильный фосфатный буфер с pH 7,2 ± 0,1	KH_2PO_4 – 0,45 г, Na_2HPO_4 – 5,34 г в 1 000 см^3 дистиллированной H_2O, стерилизовать при температуре 121 °С 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 см^3 дистиллированной воды, тщательно перемешивают, устанавливают pH 7,3 ± 0,2 и автоклавируют при 121 °С в течение 15 мин.

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

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 см^3 дистиллированной воды, устанавливают pH 7,3 ± 0,2, разливают в пробирки по 5—7 см^3 и стерилизуют при 121 °С в течение 15 мин.

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

добавляют 10 г соответствующего углевода. Устанавливают pH 7,1 ± 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 невески 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-глюкозидазной 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.

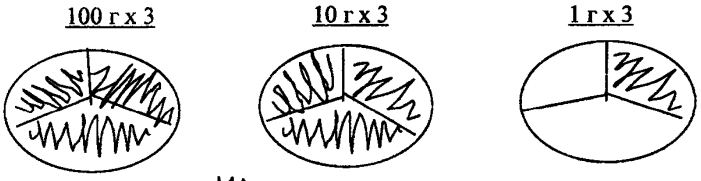
8.3. Учет результатов при количественном определении.

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 (см^3) 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 (см^3) (х 3) продукта, количество *E. sakazakii* в 1 г (см^3) 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 (см^3) 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 *E. sakazakii* (из трех выбранных значений массы (объема)			НВЧ КОЕ/г, $см^3$	Действительное число микроорганизмов в 1 г ($см^3$) с вероятностью, %			
				95		99	
1,0	0,1	0,01		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	1	2,00	0,50	3,80	0,20	5,20
2	1	2	2,70	0,90	9,40	0,50	14,20
2	2	0	2,10	0,50	4,00	0,20	5,60
2	2	1	2,80	0,90	9,40	0,50	14,20
2	2	2	3,50	0,90	9,40	0,50	14,20
2	3	0	2,90	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

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

Дополнения и изменения к МУК 4.2.2428—08

Методические указания
МУК 4.2.3144—13

Издание официальное

Москва • 2014

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

Дополнения и изменения к МУК 4.2.2428—08

Методические указания
МУК 4.2.3144—13

ББК 51.28
М54

М54 **Метод** определения бактерий *Enterobacter sakazakii* в продуктах для питания детей раннего возраста. Доп. и изм. к МУК 4.2.2428—08: Методические указания.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2014.—10 с.

ISBN 978—5—7508—1243—1

1. Разработаны Федеральным государственным бюджетным 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 санитарно-эпидемиологическому нормированию при Федеральной службе по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (протокол от 29 октября 2013 г. № 3).

3. Утверждены врио Руководителя Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главного государственного санитарного врача Российской Федерации А. Ю. Поповой 26 ноября 2013 г.

4. Введены впервые.

ББК 51.28

ISBN 978—5—7508—1243—1

© Роспотребнадзор, 2014
© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2014

УТВЕРЖДАЮ
Врио Руководителя Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главного государственного санитарного
врача Российской Федерации
А. Ю. Попова
26 ноября 2013 г.

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

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

Дополнения и изменения к МУК 4.2.2428—08

Методические указания МУК 4.2.3144—13

1. По тексту документа **изменить название** *Enterobacter sakazakii* и записать в следующей редакции *«Cronobacter spp. (Enterobacter sakazakii)»* или *«Cronobacter spp.»*.

2. Раздел 1 **«Общие положения и область применения»** дополнить п. 1.7 и изложить его в следующей редакции: «1.7. Методические указания носят рекомендательный характер».

3. Раздел 2 **«Сущность метода»** изложить в следующей редакции:

«2. Сущность метода

2.1. Метод определения бактерий *Enterobacter sakazakii (Cronobacter spp.)* основан на высеве определенных количеств продукта в жидкие неселективные среды для предварительного обогащения проб, пересеве в жидкие селективные среды для выделения бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, с последующим пересевом на поверхность твердых селективных сред, инкубировании 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 *Cronobacter spp.*

Таблица 1

Схема исследования сухих детских смесей на наличие *Cronobacter spp.*

Этап	Продолжительность инкубации, ч	Температура
1. Подготовка реактивов и материалов		
2. Растворение навесок продукта в забуференной пептонной воде (ЗПВ) в соотношении 1 : 9 (при необходимости определения количества – навесок массой 100, 10 и 1 г в 3 колбы или пробирки с ЗПВ каждая), смешивание и инкубация	18 ± 2	37 °С
3. Посев 0,1 см^3 проинкубированной суспензии в селективный питательный бульон для выделения бактерий семейства *Enterobacteriaceae* и инкубация	24 ± 2	44 °С
4. Пересев 0,1 мл проинкубированного бульона для выделения *Enterobacteriaceae* на поверхность хромогенного агара для выявления *Cronobacter spp.* (ESIA™) или фиолетово-красного желчного агара с глюкозой (VRBG-agar)	24 ± 2	44 °С
5. Отбор 5 подозрительных на *Cronobacter spp.* колоний с поверхности хромогенного ESIA-агара, отбор всех типов колоний с поверхности фиолетово-красного желчного агара с глюкозой (VRBG-agar); пересев на триптон-соевый агар с дрожжевым экстрактом (TSYEA) и инкубация	48 ± 2	25 °С
6. Отбор колоний с желтым пигментом, микроскопия по Граму и подтверждение их видовой принадлежности по биохимическим тестам идентификации		
7. Интерпретация результатов. 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 *E. sakazakii (Cronobacter spp.)*. Подтверждение принадлежности к *Cronobacter spp.* 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, подтверждающих принадлежность выделенных штаммов к роду *Cronobacter spp.* и диффе-

ренцирующих их от близкородственных представителей энтеробактерий *Enterobacter cloacae* и *Pantoea agglomerans*, приведены в табл. 2.

Таблица 2

Биохимическая дифференциация *Cronobacter spp.*

Тест или субстрат	Реакции		
	E. sakazakii (Cronobacter spp.)	*E. cloacae*	*P. agglomerans*
Желтый пигмент при 25 °С	+	–	(+)
D-сорбит	–	+	(+)
α-глюкозидаза	+	(–)	–
Разжижение желатины (22 °С)	–	–	+
Оксидаза	–	–	–
Лизиндекарбоксилаза	–	–	–
Аргининдигидролаза	+	+	–
Орнитиндекарбоксилаза	+	+	(–)
Утилизация цитратов	+	+	+
Реакция Фогес-Проскауэра	+	+	(+)
Индол	–	–	(–)
Глюкоза	+	+	+
Маннит	+	+	+
Лактоза	+	+	(+)
Сахароза	+	+	(+)
L-рамноза	+	+	(+)
D-мелибиоза	+	+	+
Амигдалин	+	–	(–)
Подвижность	+	+	(+)
Мукоидный рост	+	+	+
Примечания: «+» – 90—100 % штаммов положительные; «(+)» – 21—89 % штаммов положительные; «–» – 0—9 % штаммов положительные; «(–)» – 10—24 % штаммов положительные			

Ведущими дифференцирующими признаками *Cronobacter spp.* являются:

• способность к образованию желтого пигмента при культивировании на неселективных средах при температуре 25 °С;

• наличие α-глюкозидазной активности на хромогенных средах, содержащих 5-бромо-4-хлоро-3-индолил-α-D-глюкопиранозид;

• отсутствие способности к ферментации D-сорбита.

Для дифференциации *Cronobacter spp.* от сорбитвариабельных и обладающих желтым пигментом представителей рода *Pantoea agglomerans* (Syn: *Erwinia spp.*) используется тест разжижения желатины.».

4. **В разделе 3.3 «Реактивы и питательные среды» перечень питательных сред дополнить следующими наименованиями:**

• модифицированный лаурилсульфат триптозный бульон с ванкомицином (мЛСТ с ванкомицином);

• *Enterobacter sakazakii* хромогенный агар (ESIA™) или селективные хромогенные среды аналогичного назначения, соответствующие требованиями стандарта ISO/TS 22964:2006 IDF/RM 210:2006.

5. **Раздел 4.2 «Приготовление питательных сред» дополнить пп. 4.2.6, 4.2.7 и 4.2.8 в следующей редакции:**

«*4.2.6. Забуференная пептонная вода*

Состав среды	Концентрация, г/дм^3
Хлорид натрия (NaCl)	5,0
Ферментативный гидролизат казеина	10,0
Двузамещенный фосфат натрия 12-водный ($Na_2HPO_4 \times 12H_2O$)	9,0
Однозамещенный фосфат калия (KH_2PO_4)	1,5

Компоненты растворяют в 1 000 см^3 дистиллированной воды, тщательно перемешивают, устанавливают pH 7,0 ± 0,2 при 25 °С, и автоклавируют при 121 °С в течение 15 мин.

4.2.7. Модифицированный лаурилсульфат триптозный бульон (мЛСТ) с ванкомицином

Состав среды	Концентрация, г/дм^3
Хлорид натрия (NaCl)	34,0
Пептон ферментативный	20,0
Лактоза	5,0
Однозамещенный фосфат калия (KH_2PO_4)	2,75
Двузамещенный фосфат калия (K_2HPO_4)	2,75
Лаурилсульфат натрия ($C_{12}H_{25}NaO_5S$)	0,1

Компоненты растворяют в 1 000 см^3 дистиллированной воды, тщательно перемешивают, устанавливают pH 6,8 ± 0,2 при 25 °С, разливают по 10 мл в пробирки и автоклавируют при 121 °С в течение 15 мин.

Приготовление рабочего раствора ванкомицина: 10 мг ванкомицина растворяют в 10 см^3 дистиллированной воды, тщательно перемешивают и стерилизуют методом мембранной фильтрации. Готовый раствор ванкомицина может храниться при температуре от 0 до 5 °С в течение 15 суток.

Для получения готовой среды раствор ванкомицина вносят в каждую пробирку со стерильной основой мЛСТ в количестве 0,1 см^3 для получения конечной концентрации ванкомицина в готовой среде 10 мкг/см^3. Готовая среда может храниться при температуре от 0 до 5 °С в течение 1 суток.

4.2.8. Enterobacter sakazakii хромогенный агар (ESIA™)

Состав среды	Концентрация, г/дм^3
Панкреатический гидролизат казеина (триптон)	7,0
Дрожжевой экстракт	3,0
Хлорид натрия (NaCl)	5,0
Деоксихолат натрия	0,6
5-бромо-4-хлоро-3-индолил-α-D-глюкопиранозид ($C_{14}H_{15}BrClNO_6$)	0,15
Кристаллический фиолетовый	2 мг
Агар-агар	12,0—18,0*
* В зависимости от способности агара к гелеобразованию	

Компоненты растворяют в 1 000 см^3 дистиллированной воды, тщательно перемешивают, устанавливают pH 7,0 ± 0,2 при 25 °С, и автоклавируют при 121 °С в течение 15 мин. Стерилизованную агаровую среду охлаждают до температуры 44—47 °С и разливают по 15 см^3 в стерильные чашки Петри.

Готовая среда может храниться при температуре от 0 до 5 °С в течение 1 суток.».

5. **Раздел 6. «Проведение анализа» изложить в следующей редакции:**

«6. Проведение анализа

6.1. Пробы продуктов массой 100 г, 125 г или 137,5 г вносят в забуференную пептонную воду (ЗПВ) по п. 4.2.6 в соотношении 1 : 9 по

объему. Посевы термостатируют при температуре (37 ± 1) °С в течение (18 ± 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 отбирают 4 навески (порции) продукта массой 100 г ($см^3$) каждая для анализа. Производят посев каждой из трех навесок (порций) в 900 $см^3$ ЗПВ 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 $см^3$ ЗПВ и перемешивают. Из этой же пробы отбирают три навески (порции) продукта массой 1 г ($см^3$) и производят посев в 9 $см^3$ ЗПВ. Для посева (при необходимости – предполагаемом высоком содержании *Cronobacter spp.* в продукте) меньших количеств продукта – 0,1 и 0,01 г, делают десятикратно убывающие разведения навески массой 10 г, и вносят по 1 $см^3$ (× 3) соответствующих разведений в 9 $см^3$ ЗПВ.

Посевы термостатируют при температуре (37 ± 1) °С в течение (22 ± 2) ч.

6.3. После термостатирования проб продукта в среде для первичного накопления 0,1 $см^3$ суспензии пересевают в 10 $см^3$ модифицированного лаурилсульфат триптозного бульона с ванкомицином (арбитражная среда) или в 10 $см^3$ одной из жидких селективных сред для выделения бактерий семейства *Enterobacteriaceae* по ГОСТ 29184—91 – среду Кесслер с глюкозой, или буферный глюкозный бульон с бриллиантовым зеленым и желчью, или бульон Мак-Конки. Посевы термостатируют при температуре 44 °С в течение (24 ± 2) ч.

6.4. Из посевов после термостатирования, независимо от наличия или отсутствия признаков роста, делают пересев штрихом на поверхность хромогенного агара по п. 4.2.8 для выявления *Cronobacter spp.*, содержащего 5-бромо-4-хлоро-3-индолил-α-D-глюкопиранозид (арбитражная среда), или на поверхность фиолетово-красного желчного агара с глюкозой (VRBG-агар). Чашки с агаризованной средой предварительно подсушивают. Посевы термостатируют при температуре 44 °С в течение (24 ± 2) ч.

6.5. При отсутствии роста на поверхности хромогенного агара для выявления *Cronobacter spp.* или VRBG-агара анализ прекращают и дают заключение об отсутствии *Cronobacter spp.* в исследованной пробе.

6.6. После этапа селективного обогащения проб для обнаружения *Cronobacter spp.* (п. 6.3), допускается использовать ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в соответствии с процедурой, изло-

женной в МУК 4.2.2872—11. При получении отрицательных результатов исследований образцов предварительно обогащенных жидких селективных сред с применением ПЦР анализ прекращают и дают заключение об отсутствии *Cronobacter spp.* в исследованной пробе.

6.7. При обнаружении на чашках хромогенного агара для выявления *Cronobacter spp.* роста подозрительных культур для дальнейшего изучения отбирают 3—5 характерных колоний. При обнаружении на поверхности VRBG-агара роста дальнейшему изучению подвергают все обнаруженные варианты культур, для чего отбирают по 3—5 колоний каждого типа.

6.8. Отобранные для исследования 3—5 характерных колоний пересевают на поверхность триптон-соевого агара с дрожжевым экстрактом и термостатируют при температуре 25 °С в течение (48 ± 2) ч. В качестве положительного контроля используют референс-штамм *E. sakazakii (Cronobacter spp.)*, типичный по фенотипическим свойствам.

6.9. Культуры, растущие на триптон-соевом агаре с образованием желтого или желто-коричневого пигмента, подвергают дальнейшему изучению для подтверждения принадлежности к *Cronobacter spp.*».

6. **Раздел 10. «Нормативные ссылки» изложить в следующей редакции:**

10.1. ГОСТ Р 54005—2010 «Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества бактерий семейства *Enterobacteriaceae*».

10.2. ГОСТ ISO 7218—2011 «Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования и рекомендации по микробиологическим исследованиям».

10.3. ГОСТ Р 54004—2010 «Продукты пищевые. Методы отбора проб для микробиологических испытаний».

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. ГОСТ 26809—86 «Молоко и молочные продукты. Правила приемки, методы отбора и подготовка проб к анализу».

10.8. ГОСТ Р ИСО 707—2010 «Молоко и молочные продукты. Руководство по отбору проб».

10.9. СП 1.3.2322—08 «Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

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

10.11. Стандарт ISO/TS 22964:2006 IDF/RM 210:2006 «Milk and milk products – Detection of Enterobacter sakazakii».

10.12. МУК 4.2.2872—11 «Методы выявления и идентификации патогенных бактерий – возбудителей инфекционных заболеваний с пищевым путем передачи в продуктах питания на основе ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией».

10.13. Технический Регламент Таможенного союза ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции».

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

Дополнения и изменения к МУК 4.2.2428—08

Методические указания
МУК 4.2.3144—13

Редактор Л. С. Кучурова
Технический редактор Е. В. Ломанова

Подписано в печать 24.01.14

Формат 60x88/16 Печ. л. 0,75
Тираж 200 экз. Заказ 7

Федеральная служба по надзору
в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
127994, Москва, Вадковский пер., д. 18, стр. 5, 7

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 8(495)952-50-89

gost.e-ecolog.ru