

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

**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

M54

M54 **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.*

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 <i>Enterobacteriaceae</i> и инкубация	24 ± 2	44 °С
4. Пересев 0,1 мл проинкубированного бульона для выделения <i>Enterobacteriaceae</i> на поверхность хромогенного агара для выявления <i>Cronobacter spp.</i> (ESIA™) или фиолетово-красного желчного агара с глюкозой (VRBG-agar)	24 ± 2	44 °С
5. Отбор 5 подозрительных на <i>Cronobacter spp.</i> 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-

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

Таблица 2

Биохимическая дифференциация *Cronobacter spp.*

Тест или субстрат	Реакции		
	<i>E. sakazakii</i> (<i>Cronobacter spp.</i>)	<i>E. cloacae</i>	<i>P. agglomerans</i>
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-мслибиоза	+	+	+
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-бromo-4-хлоро-3-индолил- α -D-глюкопиранозид;

- отсутствие способности к ферментации D-сорбита.

Для дифференциации *Cronobacter* spp. от сорбитварибельных 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 (ESIATM) или селективные хромогенные среды аналогичного назначения, соответствующие требованиям 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 ₂ HPO ₄ × 12H ₂ O)	9,0
Однозамещенный фосфат калия (KH ₂ PO ₄)	1,5

Компоненты растворяют в 1 000 см³ дистиллированной воды, тщательно перемешивают, устанавливают рН 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 ₂ PO ₄)	2,75
Двузамещенный фосфат калия (K ₂ HPO ₄)	2,75
Лаурилсульфат натрия (C ₁₂ H ₂₅ NaO ₅ S)	0,1

Компоненты растворяют в 1 000 см³ дистиллированной воды, тщательно перемешивают, устанавливают рН 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 см³ 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 см³ для получения конечной концентрации ванкомицина в готовой среде 10 мкг/см³. Готовая среда может храниться при температуре от 0 до 5 °С в течение 1 суток.

4.2.8. *Enterobacter sakazakii* хромогенный агар (ESIATM)

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 см³ дистиллированной воды, тщательно перемешивают, устанавливают рН 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 см³ 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 $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение (18 ± 2) ч.

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

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

Из четвертой навески (порции) массой (объемом) $100\text{ г (см}^3\text{)}$ отбирают три навески (порции) продукта массой $10\text{ г (см}^3\text{)}$ и производят посев в 90 см^3 ЗПВ и перемешивают. Из этой же пробы отбирают три навески (порции) продукта массой $1\text{ г (см}^3\text{)}$ 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 $0,01\text{ г}$, делают десятикратно убывающие разведения навески массой 10 г , и вносят по $1\text{ см}^3 (\times 3)$ соответствующих разведений в 9 см^3 ЗПВ.

Посевы термостатируют при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение (22 ± 2) ч.

6.3. После термостатирования проб продукта в среде для первичного накопления $0,1\text{ см}^3$ 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°C 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°C 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 гибридно-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

Тираж 200 экз.

Печ. л. 0,75
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