

# ТЕХНОЛОГИЯ САНИТАРНОЙ ОБРАБОТКИ

УДК 613.2; 579.674; 579.252.55

Поступила в редакцию 9 декабря 2024 года

*Н.Р. Ефимочкина, д.б.н., С.А. Шевелёва, д.м.н., Ю.М. Маркова, к.б.н.,  
Ю.В. Смотрина, И.Б. Быкова, А.С. Полянина, В.В. Стеценко, Е.С. Симоненко  
ФИЦ питания и биотехнологии, Москва, Российская Федерация*

## ЭМЕРДЖЕНТНЫЕ ПАТОГЕНЫ РОДА *CRONOBACTER* В ПРОДУКТАХ ДЛЯ ПИТАНИЯ ДЕТЕЙ В РОССИИ: ХАРАКТЕРИСТИКИ КОНТАМИНАЦИИ, ПУТИ МИНИМИЗАЦИИ

*N. Efimochkina, S. Sheveleva, Yu. Markova, Yu. Smotrina,  
I. Bykova, A. Polyanina, V. Stetsenko, E. Simonenko  
Federal Research Center of Nutrition and Biotechnology, Moscow, Russian Federation*

### EMERGENT *CRONOBACTER* PATHOGENS IN CHILDREN'S FOOD PRODUCTS IN RUSSIA: CONTAMINATION CHARACTERISTICS, MINIMIZATION PATHS

*e-mail: karlikanova@ion.ru, sheveleva@ion.ru, yulia.markova.ion@gmail.com,  
ulya\_korotkevich@mail.ru, bikova@ion.ru, stetsenko\_valentina1992@mail.ru.*

*Представлены результаты первого этапа работ по гранту Российского научного фонда №23-16-00163 «Эмерджентные патогены рода *Cronobacter* (*E. sakazakii*) в продуктах для питания детей отечественного производства: новые аспекты безопасности».*

*Установлено присутствие *C.sakazakii* в сухих продуктах для вскармливания и прикорма детей раннего возраста, а также компонентах для их изготовления, циркулирующих на рынке РФ, с частотой от 1,6% до 11,1%% при уровнях патогена 0,01 - 10 КОЕ/г, опасных для восприимчивого организма. Наибольшая частота выявления отмечена в компонентах, предназначенных для сухого смешивания.*

*Оценка технологии молочных смесей полного цикла по методологии оценки микробиологического риска показала возможность сохранения патогена в количествах, превышающих установленный норматив для *C.sakazakii* в готовой продукции (<0,003 КОЕ/г), при содержании БГКП в сыром молоке  $3 \times 10^5$  КОЕ/г и выше.*

*Обоснована необходимость повышения требований к микробиологическому качеству молока сырого для производства детского питания, а также внедрения в контроль патогенов рода *Cronobacter* в продуктах для детей раннего возраста методов молекулярного анализа.*

*Для снижения риска загрязнения *Cronobacter* spp. окружающей среды на предприятиях, вырабатывающих сухие детские продукты,*

*The results of the first stage of work under the grant of the Russian Science Foundation No. 23-16-00163 "Emergent pathogens of the genus *Cronobacter* (*E. sakazakii*) in domestically produced baby food products: new safety aspects" are presented.*

*The presence of *C.sakazakii* in dry products for feeding and complementary feeding of young children, as well as components for their manufacture, circulating on the Russian market, was established with frequency from 1.6% to 11.1%% at levels 0,01 - 10 CFU/g, dangerous for a susceptible organism. The highest frequency of pathogen detection was recorded in components intended for dry mixing.*

*The results of the first stage of work under the grant of the Russian Science Foundation No. 23-16-00163 "Emergent pathogens of the genus *Cronobacter* (*E. sakazakii*) in domestically produced baby food products: new safety aspects" are presented.*

*The presence of *C.sakazakii* in dry products for feeding and complementary feeding of young children, as well as components for their manufacture, circulating on the Russian market, was established with frequency from 1.6% to 11.1%% at levels 0,01 - 10 CFU/g, dangerous for a susceptible organism. The highest frequency of pathogen detection was recorded in components intended for dry mixing.*

*The presence of *C.sakazakii* in dry products for feeding and complementary feeding of young children, as well as components for their*

обоснована необходимость оптимизации систем HACCP на всех этапах производства, включая дезинфекцию оборудования и инвентаря. Это связано с подтверждённой большей устойчивостью *C.sakazakii* к воздействию температур, дезинфектантов в сравнении с другими видами контаминирующих сухие продукты энтеробактерий.

manufacture, circulating on the Russian market, was established with frequency from 1.6% to 11.1% at levels 0,01 - 10 CFU/g, dangerous for a susceptible organism. The highest frequency of pathogen detection was recorded in components intended for dry mixing.

Assessment of the full-cycle milk formulas technology using the microbiological risk assessment methodology showed the possibility of preserving of pathogen in quantities exceeding the established standard for *C.sakazakii* in finished products (<0.003 CFU/g), with a coliforms content in raw milk of  $3 \times 10^5$  CFU/g and higher.

The need to increase the requirements for the microbiological quality of raw milk for the production of baby food, as well as the introduction of molecular analysis methods for the control of pathogens of the genus *Cronobacter* in products for young children, is substantiated.

To reduce the risk of *Cronobacter* spp. contamination of the environment at enterprises producing dry infants foods, the need to optimize HACCP systems at all stages of production, including disinfection of equipment and inventory is substantiated. This is due to the confirmed greater resistance of *C.sakazakii* to the effects of temperatures, disinfectants in comparison with other types of enterobacteria contaminating dry products.

**Ключевые слова:** эмерджентные патогены; *Cronobacter sakazakii*; продукты для питания детей раннего возраста сухие.

**Key words:** emergent pathogens; *Cronobacter sakazakii*; dry infant food products.

**Введение.** Энтеробактерии рода *Cronobacter* признаны ВОЗ облигатными патогенами для детей раннего возраста [1]. Их представители *C.sakazakii* и *C.malonaticus* обуславливают до 70% подтверждённых случаев некротизирующего энтероколита и других септических инфекций у детей. В группе наибольшего риска – маловесные новорожденные, заболеваемость у которых может достигать 25%, а летальность – 60% от суммы всех постнатальных инфекций. Рост этих заболеваний связывают с распространением искусственного вскармливания и расширением контингента восприимчивых детей. Фактором передачи возбудителя считается сухое детское питание: смеси для искусственного вскармливания (СМС), инстантные каши. Доза инфекта экстремально низкая (менее 0,3 КОЕ/г), а колонизации кишечника способствует его незрелость, отсутствие защитных факторов грудного молока и низкое биоразнообразие микробиоты у младенцев.

На сегодня недостаточно изучены причины сохранения кронобактеров в сухих продуктах, хотя есть сведения об их более высокой терморезистентности в сравнении с другими энтеробактериями и способности переживать технологические стрессы [2,3].

В условиях масштабирования отечественного производства детского питания и диверсификации источников сырья, требуется максимально объективная оценка безопасности компонентов и вырабатываемых продуктов в отношении *Cronobacter* spp. и обоснование путей его минимизации на этапе выработки.

**Материалы и методы.** Исследовали образцы сухих продуктов для детей раннего возраста – инстантные СМС, каши молочные и зерновые, компоненты для их

изготовления (молоко сухое, растительная мука); штаммы энтеробактерий, включая *Cronobacter* spp., протоколы санитарно-эпидемиологических экспертиз. В работе применяли методы бакпосева, биохимической идентификации, ПЦР с экстрагированной микробной ДНК, информационно-статистической обработки.

**Результаты и обсуждение.** По материалам экспертиз 534 образцов СМС и каш был проведен ретроспективный анализ (с 2005 г.) их контаминации энтеробактериями, в т.ч. кронобактерами. По данным анализа *Cronobacter* spp. присутствовали в 1,59% сл. в инстантных СМС, и в 0,7% сл. в кашах, изготовленных по технологии сухого смешивания. Исследования на *Cronobacter* spp. данной выборки проводились методом бакпосева и только в тех случаях, если при анализе на БГКП и сальмонеллы выявлялись другие энтеробактерии, что позволяло расценивать полученную информацию, как скрининг загрязнённости.

За первый год работы оценена микробицидная эффективность отечественных технологий производства сухих продуктов детского питания в отношении *Cronobacter* spp. с учётом его биологических свойств, изучена распространенность патогена и близкородственных ему терморезистентных энтеробактерий в СМС, кашах и компонентах для их изготовления, а также фенотипические особенности изолятов и их устойчивость к неблагоприятным воздействиям.

Так, современные технологии СМС и каш классифицированы по группам, как осуществляемые путем: 1) производства полного цикла с собственной сырьевой базой; 2) смешивания сухих компонентов, их регидратации, пастеризации смеси, и сушки; 3) сухого смешивания компонентов; 4) переупаковки. Проработаны отечественные типовые технологические инструкции по производству СМС путём распылительной сушки, на основе данных об их параметрах построена модульная модель процесса риска (ММПР) и оценена вероятность выживания патогена в СМС при стандартных условиях. Показано, что при содержании БГКП в сыром молоке на уровне КМАФАнМ 300000–500000 КОЕ/мл в конечном продукте может сохраняться 0,3–0,5 КОЕ/г *Cronobacter* spp., что превышает установленный норматив – «Бактерии рода *Cronobacter* не допускаются в 300 г продукта (<0,003 КОЕ/г)». Обоснована необходимость повышения требований к микробиологическому качеству молока-сырья для выработки детского питания – до уровня микробного числа не более 100000 КОЕ/мл, что обеспечит отсутствие всех БГКП, включая *C. sakazakii*, в 1 г СМС. Использование ММПР рекомендовано для включения в планы НАССР на предприятиях в качестве превентивной меры снижения контаминации готовых сухих продуктов для детского питания *Cronobacter* spp.[4].

Изучено 66 образцов продуктов для питания младенцев (СМС начальные и последующие, каши молочные и безмолочные) и компонентов для их производства, приобретенных в торговой сети Московского региона. 82,2% СМС и продуктов прикорма были изготовлены по технологии сухого смешивания, продукты по технологии регидратации/сушки и полного цикла составляли 17,8%. Частота обнаружения *Cronobacter* spp. в исследованных пробах в среднем составила 6,1% (таблица 1). Эти бактерии не обнаруживались в СМС и специализированных смесях для лечебного питания, но были выделены из инстантных и требующих варки каш, а также из компонентов (молоко сухое, мука рисовая) на уровне от 0,01 до 10 КОЕ/г. Использование таких компонентов в технологии сухого смешивания не гарантирует отсутствия возбудителя в готовом продукте или его содержания ниже уровня, признанного опасным для восприимчивых детей.

Таблица 1 – Частота обнаружения и уровни *Cronobacter* spp. и сопутствующей микрофлоры в образцах СМС, продуктах прикорма и компонентах.

Группа продукции	Количество проб	Показатели							Примечание
		<i>Cronobacter</i> spp., % (КОЕ/г)	КМАФАнМ, lg КОЕ/г (M±m)	БГКП в 1 г продукта, %	<i>E.coli</i> в 1,0 г и 10 г продукта	<i>Enterobacteriaceae</i> lg КОЕ/г (средние значения)	<i>Salmonella</i> в массе продукта	<i>B.cereus</i> , КОЕ/г (M ср.)	
СМС с рождения	10	0 (<0,003)	1,44 ± 0,17	Н.о.	Н.о.	0*	Н.о. в 100 г	< 20	*Н.о. в 1 г
СМС последующие и напитки молочные сухие	7	0 (<0,003)	1,77 ± 0,20	Н.о.	Н.о.	0*	Н.о. в 100 г	< 20	*Н.о. в 1 г
Каши молочные инстантные	21	4,8* (<0,003)	1,85 ± 0,13	9,5	Н.о.	0,29	Н.о. в 50 г	< 20	Подтверждено ПЦР, при отрицательном результате посева
Каши безмолочные инстантные	4	0 (<0,003)	1,90 ± 0,30	Н.о.	Н.о.	0*	Н.о. в 50 г	< 20	Н.о. в 1 г
Каши безмолочные, требующие варки	3	33,3 (10)*	3,02 ± 0,58	Н.о.	Н.о.	1,6	Н.о. в 50 г	13,3	* <i>Cronobacter</i> spp. обнаружены в 0,1 г
Компоненты молочные	9	11,1 (>0,01)*	3,13 ± 0,66	11,1	Н.о.	0,33	Н.о. в 25 г	н/д	* <i>Cronobacter</i> spp. обнаружены в 100 г
Компоненты немолочные	12	8,3 (>0,1)*	2,22 ± 0,45	Н.о.	Н.о.	0,25	Н.о. в 25 г	н/д	* <i>Cronobacter</i> spp. обнаружены в 10 г и 100 г
Всего	66	6,1%	2,08 ± 0,15	4,5	Н.о.	-	Н.о.	-	-

Н.о. – не обнаружены

Источник данных: собственная разработка

Проведена идентификация 29 штаммов терморезистентных энтеробактерий, изолированных из образцов сухой продукции. Как видно из рисунка 1, в общем пуле таких бактерий штаммам кронобактеров сопутствовали представители ещё 5 родов. Среди изолятов около половины приходилось на *Enterobacter* spp. и *Pantoea* spp., мимикрировавших некоторые культуральные признаки кронобактеров (ферментация лактозы, жёлтый пигмент).

Настораживало, что из образцов компонентов (молоко сухое, мука растительная) для детских продуктов, вырабатываемых путём сухого смешивания, выделялись опасные для младенцев условно-патогенные бактерии *Klebsiella pneumoniae* и *Escherichia hermannii* & *vulneris*. В целом эти результаты подтверждали необходимость повышения специфичности методов определения целевого патогена.

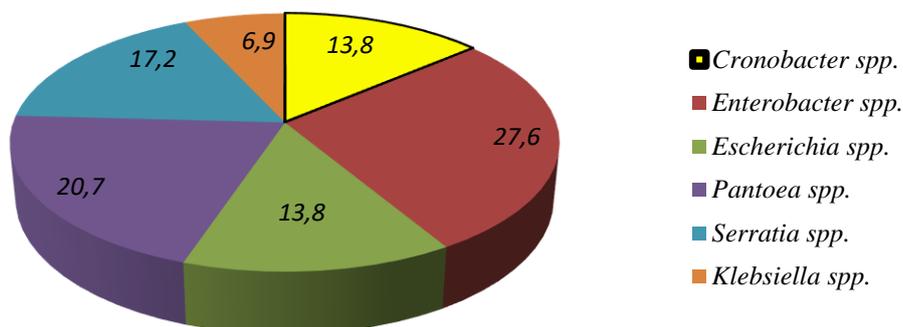


Рисунок 1 – Родовой состав пула энтеробактерий, выделенных из сухих продуктов детского питания.

Источник данных: собственная разработка.

На то же самое указывали и результаты биохимической идентификации, показавшие принадлежность изолятов к видам *C. sakazakii*, *C. malonaticus*. Использование тестов для энтеробактерий API 20E (BioMerieux) не обеспечивало достоверного подтверждения видовой принадлежности *Cronobacter* spp. и потребовало применения расширенного набора фенотипических тестов для идентификации патогена.

Для этих же целей с использованием ПЦР проведена прямая детекция *Cronobacter* spp. в среде накопления, а также идентификация изолятов (таблица 2). Была показана большая специфичность и эффективность ПЦР-детекции (при обеспечении условий селективного накопления кронобактеров), что позволило подтвердить видовую принадлежность изолятов в случаях, когда она не была установлена или была неверной в фенотипе. Для типирования *Cronobacter* spp. необходим подбор как видоспецифичных праймеров для всех видов рода, так и праймеров для генов, ассоциированных с их серотипами, патогенностью, био пленкообразованием, стресс-ответами.

Для оценки антибиотикоустойчивости *Cronobacter* spp. проведен скрининг фенотипической чувствительности 26 пищевых изолятов *Cronobacter*, а также сопутствующих *Enterobacter*, *Pantoea*, *Escherichia*, *Serratia* spp. к 11 фармгруппам антимикробных препаратов (АМП). Все штаммы *Cronobacter* spp. отличались высокой устойчивостью к цефалоспорином (100%), фторхинолонам, нитрофурану и макролидам (по 25% сл.), а также корезистентностью к 2–4 группам АМП.

Таблица 2 – Результаты прямой детекции *Cronobacter* spp. в образцах пищевой продукции методом ПЦР и идентификации выделенных культур.

Шифр образца	Результаты фенотипического анализа		Результаты ПЦР	
	Бакпосев и первичная идентификация до рода	Биохимическая идентификация до вида	Прямая детекция в среде культивирования	ПЦР-идентификация выделенного штамма
<i>C.sakazakii</i> ССМ 3461			+	<i>C.sakazakii</i>
<i>C.sakazakii</i> 294	+	<i>C.malonaticus</i>	+	<i>C.sakazakii</i>
37.23	-	<i>Serratia ficaria</i>	+	<i>C.sakazakii</i>
44.23	+	<i>C.sakazakii</i>	+	<i>C.sakazakii</i>
47.23	+	<i>C.sakazakii</i>	+	<i>C.sakazakii</i>
50.23	-	<i>Escherichia vulneris, Pantoea spp.</i>	+(слабый сигнал, Ct >33)	<i>C.sakazakii</i>
62.23	+	<i>Cronobacter</i> spp.	+	<i>C.sakazakii</i>
Итого подтверждённых штаммов	5/7	5/7	7/7	7/7

+ – обнаружены

- – не обнаружены

Источник данных: собственная разработка

Оценена выживаемость кронобактеров и сопутствующих им в сухих продуктах штаммов в условиях сублетальных для неспорообразующих грамотрицательных бактерий температур, с варьированием температурно-временных параметров воздействия в двухфакторной модели (t от 48°C до 60°C в течение 10 – 90 мин) при концентрации суточных культур в физиологическом растворе  $\sim 3 \times 10^8$  клеток/мл. Виды энтеробактерий были вариабельны по отношению к нагреву: при температуре 56°C в наименьшей степени ингибировались сальмонеллы, при 58°C и 60°C наибольшую выживаемость отмечали у штаммов *C. sakazakii*, *E. cloacae* и *Pantoea* spp.

Проведен сравнительный анализ чувствительности к хлорсодержащим биоцидам (Na соли дихлоризоциануровой кислоты) *Cronobacter* spp. и сопутствующих энтеробактерий с использованием хромогенной модели оценки ингибирования грамотрицательной флоры [5]. Измеряли ингибирование роста тест-штаммов в зависимости от их концентраций в суспензиях и от концентраций активного хлора, приближенных к применяемым в условиях пищевых производств. Эффект биоцида оценивали по характеру роста штаммов в глюкозо-пептонной среде после их контакта с хлором в модели. Контролем служили те же разведения штаммов без добавления хлора, а также пробы инокулированной среды.

Показано, что концентрации активного хлора 50–100 мг/дм<sup>3</sup>, используемые для обработки поверхностей на предприятиях, не эффективны для *Enterobacteriaceae* spp., если плотность микробной популяции составляет 10<sup>4-6</sup> клеток/см<sup>3</sup> и выше. При концентрациях хлора 75–100 мг/дм<sup>3</sup> степень чувствительности пищевых изолятов различалась – наименее чувствительными здесь были *Salmonella*, *Pantoea* и *Cronobacter* spp. Полученные данные о чувствительности *Cronobacter* spp. к хлору полезны для подбора его эффективных концентраций при санитарной обработке на предприятиях по производству сухих продуктов для детского питания.

**Заключение:** Таким образом, за первый год выполнения проекта удалось получить представление о контаминации отечественных сухих продуктов для детей раннего возраста патогенными бактериями рода *Cronobacter* и предложить подходы к её снижению, а также конкретизировать направления дальнейших исследований.

**Выводы:** - путём ретроспективного скрининга загрязнённости и исследований сухих СМС для питания детей с рождения, продуктов прикорма (каш), компонентов для их производства показано присутствие патогенных *C. sakazakii* в таких продуктах в диапазоне от 1,6% до 11,1% на уровне до 10 КОЕ/г, опасном для восприимчивого организма. Наибольшая частота выявления патогена фиксировалась в компонентах, предназначенных для сухого смешивания.

- поэтапная оценка технологии СМС полного цикла с использованием ММПР показала, что при содержании БГКП в сыром молоке на уровне  $>10^5$  КОЕ/г в готовом продукте может сохраняться  $>0,3$  КОЕ/г *C. sakazakii*, что превышает уровень установленного норматива. Обоснована необходимость повышения микробиологических требований к молоку сырому для детского питания.

- обоснована необходимость внедрения методов молекулярного анализа в контроль патогенов рода *Cronobacter* в продуктах для питания детей раннего возраста для определения достоверных таксономических характеристик кронобактерий и сопутствующих энтеробактерий, сохраняющихся в сухих продуктах.

- изолированные из сухих детских продуктов *C. sakazakii*, *E. cloacae* и *Pantoea* spp. демонстрируют большую устойчивость в сравнении с другими видами энтеробактерий при воздействии сублетальных температур и хлорсодержащих биоцидов. Это свидетельствует о необходимости повышения эффективности систем НАССР на всех этапах производства, в том числе при выборе средств дезинфекции.

**Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда в рамках гранта №23-16-00163 «Эмерджентные патогены рода *Cronobacter* (*E. sakazakii*) в продуктах для питания детей отечественного производства: новые аспекты безопасности».**

### Список использованных источников

1. Санитарно-гигиенические нормы и правила. Смеси сухие для детей грудного и раннего возраста. САС/RCP 66-2008. – 32 с.

2. Emergent methods for inactivation of *C. sakazakii* in foods: A systematic review and meta-analysis Maria Paula M. B. B. Goncalves, Leonardo do Prado-Silva, Anderson S. Sant'Ana./International Journal of Food Microbiology 421 (2024) 110777; – Mode of acces: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2024.110777>. – Date of acces: 22.11.2024

3. Torrents-Masoliver, B., Sandjong D., Jofré, A., Ribas-Agustí A., Muñoz I., Felipe X., Castellari M. et al. 2022. "Hazard Control Through Processing And Preservation Technologies For Enhancing The Food Safety Management Of Infant Food Chains". Global Pediatrics 2: 100014. doi:10.1016/j.gped.2022.100014.

4. А. С. Полянина, И.Б. Быкова, Е.С. Симоненко, Н.Р. Ефимочкина, С.А. Шевелёва. Обоснование путей снижения контаминации бактериями рода *Cronobacter* сухих специализированных продуктов для детского питания на этапе их производства./Анализ риска здоровью. 2024. № 1. – с.59–70. DOI: 10.21668/health.risk/2024.1.05.

1. Sanitarno-gigienicheskie normy i pravila. Smesi suhie dlya detej grudnogo i rannego vozrasta [Dry mixtures for infants and young children]. САС/RCP 66-2008. – 32 s.

4. A. S. Polyamina, I.B. Bykova, E.S. Simonenko, N.R. Efimochkina, S.A. Shevelyova. Obosnovanie putej snizheniya kontaminacii bakteriyami roda *Cronobacter* suhikh specializirovannyh produktov dlya detskogo pitaniya na etape ih proizvodstva [Justification of ways to reduce contamination of dry specialized baby food products with *Cronobacter* bacteria at the production stage] /Analiz riska zdorov'yu.

5. Ефимочкина Н. Р., Быкова И.Б., Короткевич Ю.В. с соавт. Изучение толерантности энтеробактерий к хлорсодержащим биоцидным средствам в экспериментальных моделях с использованием индикаторных тест-систем // Анализ риска здоровью, 2015. - № 3 (11). – с.73-82.

2024. № 1. – с.59-70. DOI: 10.21668/health.risk/2024.1.05.

5. Efimochkina N. R., Bykova I.B., Korotkevich Yu.V. s soavt. Izuchenie tolerantnosti enterobakterij k hlorsoderzhashchim biocidnym sredstvam v eksperimental'nyh modelyah s ispol'zovaniem indikatoryh test-sistem [Study of tolerance of enterobacteria to chlorine-containing biocidal agents in experimental models using indicator test systems] // Analiz riska zdorov'yu, 2015. - № 3 (11). – с.73-82.