



Enterobacter sakazakii в харчових продуктах — наскільки реальна загроза?

С.М. Кузьминський, кандидат мед. наук

Інститут екогігієни і токсикології ім. Л.І. Медведя, м. Київ

Резюме. Широко розповсюджені мікроорганізми *Enterobacter sakazakii*, які інколи знаходять в дитячих сухих молочних сумішах, можуть викликати тяжкі системні інфекційні захворювання у немовлят. Забруднення *Enterobacter sakazakii* інших видів харчових продуктів не становить істотної загрози для споживачів. У даному огляді систематизуються відомі дані щодо таксономії, біологічних властивостей, особливостей епідеміології, методів виявлення збудника в харчових продуктах, факторах ризику *Enterobacter sakazakii*-інфекцій та шляхах їх мінімізації.

Ключові слова: *Enterobacter sakazakii*, сухі молочні суміші, фактор ризику, інфекційні захворювання, таксономія

Резюме. Широко распространенные микроорганизмы *Enterobacter sakazakii*, которые иногда обнаруживают в детских сухих молочных смесях, могут вызывать тяжелые системные инфекционные заболевания у новорожденных. Загрязнение *Enterobacter sakazakii* других категорий пищевых продуктов не представляет существенной угрозы для потребителей. В данном обзоре систематизируются имеющиеся данные по таксономии, биологическим свойствам, особенностям эпидемиологии, методам выявления возбудителя в пищевых продуктах, факторах риска *Enterobacter sakazakii*-инфекций и путях их минимизации.

Ключевые слова: *Enterobacter sakazakii*, сухие молочные смеси, фактор риска, инфекционные заболевания, таксономия.

Summary. The ubiquitous microorganism *Enterobacter sakazakii* is a rare contaminant of infant formula and may cause severe systemic infections in neonates. *E.sakazakii*-contaminated food other than infant formula and milk powder do not have general public health significance. This review systematizes publications on taxonomy, biological properties, epidemiological features, methods for detection in foods, risk factors of *E.sakazakii*-infections and the ways of their minimization.

Key words: *Enterobacter sakazakii*, dry infant formula, risk factor, infectious diseases, taxonomy.

Характеристика збудника

Enterobacter sakazakii — грамнегативні паличкоподібні бактерії родини кишкових бактерій (*Enterobacteriaceae*), більшість штамів продукують жовтий пігмент.

Продemonстровано здатність деяких з них до утворення ентеротоксину-подібних сполук, заподіяння цитотоксичного ефекту на культурах клітин та летальної дії при пероральному введенні новонародженим мишенят [1], персистенції всередині макрофагів упродовж 48 годин та резистентності до антимікробних факторів сироватки крові [2].

Захворювання, пов'язані з *Enterobacter sakazakii*

Уперше про захворювання, пов'язане з *Enterobacter sakazakii* (менінгіт новонародженого), було повідомлено в 1958 році, а наукове визначення збудника відбулося лише в 1980 р. [3]. Проблемі інфекційної патології, викликаній *Enterobacter* (з 2007 р. *Cronobacter sakazakii*), присвячено понад сотню публікацій, в тому числі ґрунтовна монографія [4], відбулася міжнародна конференція (Дублін, 2009). За цей час лабораторно підтверджено понад 70 випадків різноманітних захворювань (хоча на думку експертів ВООЗ їх реальна кількість значно більша) [5]. Розширену інформацію [2] наведено в таблиці 1.

Enterobacter sakazakii пов'язані переважно з трьома типами інфекційних захворювань у немовлят — менінгіт, некротизуючий ентероколіт, бактеріємія. Більшість випадків мали місце у дітей раннього віку — в 50% випадків немовлята молодше 1 місяця, в 75% випадків у народжених з вагою менше 2,5 кг. У дітей старшого віку та дорослих спостерігали різноманітні форми патології. Всі дорослі хворі мали обтяжуючі супутні захворювання (переважно онкологічні). Інфікування *Enterobacter sakazakii* людей, необтяжених іншими хворобами, досі невідомі, хоча є повідомлення про випадки носійства в ротовій порожнині та кишківнику, пов'язані із споживанням контамінованої їжі [6]. Це свідчить про те, що *Enterobacter sakazakii* вражає переважно імунокомпрометованих пацієнтів та осіб з дефіцитом нормальної мікрофлори кишківника, яка могла б протистояти умовно-патогенним мікроорганізмам. У дорослих хворих інфекція має переважно ендемічне походження.

Enterobacter sakazakii в сухих дитячих молочних сумішах

Для дітей раннього віку можна вважати остаточно доведеним, що зараження відбувалося через сухі швидкорозчинні молочні суміші. Про це свідчать результати мікробіологічних, молекулярно-генетичних та епідеміологічних (статистичних) досліджень [7, 8]. Повідомляється про знахідки

Таблиця 1 .

Випадки інфекцій *Enterobacter sakazakii* в різних країнах від 1958 р.

Країна, рік	Кількість випадків захворювань	Кількість померлих	Джерело інфекції
Велика Британія, 1958	2	2	Не встановлено
Данія, 1958	1	1	Не встановлено
Данія, 1983	8	6	Ймовірно суха молочна суміш
Греція, 1984	11	4	Не встановлено
Ісландія, 1986--87	3	1	Суха молочна суміш
США, 1988	4	0	Суха молочна суміш та блендер
Бельгія, 1998	12	2	Суха молочна суміш
Ізраїль, 1999--2000	2	0	Суха молочна суміш та блендер
США, 2001	10	1	Суха молочна суміш
Бельгія, 2002	1	1	Суха молочна суміш
Нова Зеландія, 2004	5	1	Суха молочна суміш
Франція, 2004	4	2	Суха молочна суміш
Швейцарія, 2006	2	2	Не встановлено

Enterobacter sakazakii в сухих дитячих сумішах на території Росії [9]. Нещодавно в Україні проведено дослідження частоти та рівнів контамінації *Enterobacter sakazakii* сирого збірного молока [10]. Згадані мікроорганізми були виявлені в 16 — 24% зразків проб сирого молока (залежно від гатунку), в 52% змивів зі шкірних покривів корів, у 16 — 37% змивів з доїльного обладнання та в 75% змивів з підлоги корівників. При цьому середня кількість *Enterobacter sakazakii* становила $1,2 \times 10^2$ — $4,7 \times 10^3$ в 1 см^3 молока, $8,7 \times 10^4$ в 1 см^3 змиву з поверхні шкіри корів $6,7 \times 10^1$ в 1 см^3 змивів з обладнання та $6,7 \times 10^5$ в 1 см^3 змивів з підлоги корівника.

У Швейцарії *Enterobacter sakazakii* виявляли у 8,4% з 200 проб готових сухих молочних сумішей при тому, що в жодній з проб сировини (100 проб сирого молока та 100 проб молочного концентрату) їх знайдено не було [2].

Нестача епідеміологічних даних не дозволяє точно визначити "інфікуючу дозу", проте вірогідно вона досить низька. Передача збудника від хворого до хворого мало ймовірна. Летальність при захворюваннях, викликаних *Enterobacter sakazakii*, у новонароджених сягала 50%, проте в останні роки зменшилась до 20% [11]. У Сполучених Штатах

Америки захворюваність серед недоношених новонароджених (з вагою менше 1,5 кг становила 9,4 на 100 000 [5].

Чутливість до антибіотиків

Більшість штамів *Enterobacter sakazakii* чутливі до ампіциліну, тетрацикліну, левоміцетину, гентаміцину та третьої генерації цефалоспоринів, проте в 1995 — 96 роках у клініці університету штату Масачусетс було виділено ізоляти, які були резистентні до ампіциліну та цефазоліну. Застосування цефалоспоринів третьої генерації дозволило знизити летальність у пацієнтів з менінгітом, викликаним *Enterobacter sakazakii*, з 62 до 14% [12].

Стійкість до факторів довкілля

Enterobacter sakazakii має незвично високу серед інших ентеробактерій стійкість до висушування та підвищеної температури. Натомість належна пастеризація (72°C 15 сек.) надійно інактивує *Enterobacter sakazakii* в молоці. Між тим, є дані про виживання 20% клітин *Enterobacter sakazakii* після мікрохвильової обробки рідких молочних сумішей (2450 MHz, 600 W) [13]. Здатність *Enterobacter sakazakii* продукувати капсулу [14] та утворювати біоплівки [15] сприяє опірності до ультрафіолетового опромінювання, підвищеного осмотичного тис-

ку, кислотного середовища та деяких детергентів. Деякі штами можуть колонізувати поверхні з полікарбонату, полівінілхлориду, сілікону, латексу [16] і навіть скла [15] та нержавіючої сталі [17].

Методи виявлення в харчових продуктах

Для виявлення *Enterobacter sakazakii* в сухих молочних продуктах існують стандартизовані методи [18, 19], проте адекватність їх піддається сумніву [20]. Для підтвердження видової приналежності *Enterobacter sakazakii* можуть застосовуватись комерційні тест-системи, наприклад API ZYM, яка містить 19 субстратів. Однак 70 — 90% штамів *Enterobacter sakazakii* не утворюють газу з лактози за температури 35°C, натомість деякі ізоляти з навколишнього середовища здатні до газоутворення за температури 44°C протягом 24 годин [21]. Розробляється нова редакція стандарту ISO/TS 22964:2006 Milk and milk products. Detection of *Enterobacter sakazakii*, в якій значною мірою будуть усунуті існуючі недоліки. А саме: неможливість дослідження всіх видів сухих молочних сумішей, невідповідність сучасному стану таксономії бактерій *Cronobacter*, відмова від жовтого пігменту, як видової ознаки, застосування нових поживних середовищ (*Cronobacter Screening Broth* та модифікований DFI-agar), які містять дещо менше інгібіторів сторонньої мікрофлори і дозволяють збільшити кількість отриманих ізолятів [20]. За допомогою молекулярно-генетичних методів доведено, що певна кількість штамів, ідентифікована біохімічними тест-системами як *Enterobacter sakazakii*, належить до інших таксономічних груп [22]. Останнім часом розроблено високочутливий, високоспецифічний та швидкий метод кількісного визначення *Enterobacter sakazakii* в сухих молочних сумішах за допомогою ланцюгової полімеразної реакції в реальному часі [23]. Виявлення дуже малих концентрацій *Enterobacter sakazakii* (< 10 клітин в 100 г сухої молочної суміші), як це передбачено нормативними документами Європейського Союзу [24], може бути здійснено протягом 48 годин за допомогою нового методу з використанням видоспецифічного олігонуклеотиду [25]. Для визначення ідентичності ізолятів з харчових продуктів та довкілля, що є дуже важливим при проведенні епідеміологічного розслідування випадків групових захворювань, корисним може бути метод рандом-ампліфікації поліморфної ДНК [22].

Поширеність у довкіллі, в тому числі в харчових продуктах, відмінних від сухих молочних сумішей

Enterobacter sakazakii дуже поширений в довкіллі, зокрема в ґрунті, воді, в тому числі в термальній джерельній воді [26], а також в пилу помешкань та підприємств харчової промисловості. Здатність до розчинення фосфатів та продукції індол-оцтової кислоти забезпечують можливість тривалої колонізації багатьох рослин (томати, зернові культури та толерантні до солі рослини). В ро-

боті M.Friedemann [27] проаналізовані дані про знахідки *Enterobacter sakazakii* в інших харчових продуктах, окрім дитячих молочних сумішей, а саме 46 повідомлень про знахідки *Enterobacter sakazakii* в продуктах рослинного походження, 29 повідомлень — в продуктах тваринного походження, 7 повідомлень — в рибі, 14 повідомлень — у воді, в тому числі питній бутильованій.

Ризики, пов'язані з *Enterobacter sakazakii* в харчових продуктах

Будь-яка необроблена харчова сировина, а також об'єкти довкілля можуть вважатись потенційними джерелами контамінації харчових продуктів *Enterobacter sakazakii*, яка можлива на всіх етапах виробництва. Про це можуть свідчити неодинокі випадки виявлення цих збудників у харчовій сировині, в організмі комах [28] та щурів [29], на блендерах і ложках, які застосовують при розчиненні сухих дитячих сумішей, а також на губках для миття посуду [30]. Зважаючи на убиквітарність *Enterobacter sakazakii*, знахідки цих мікроорганізмів у харчових продуктах, окрім продуктів спеціального призначення (в тому числі сухих дитячих молочних сумішей), не завжди свідчать про недодержання гігієнічного режиму і не завжди являють собою небезпеку для здоров'я людей [27]. Спеціальні заходи щодо запобігання забрудненню *Enterobacter sakazakii* та іншими умовно-патогенними ентеробактеріями застосовують лише до харчових продуктів, призначених для спеціальних контингентів, як то немовлята до 6 місячного віку та інші групи споживачів з вродженою або набутою недостатністю імунної системи.

Наголошується, що відносно невеликий ризик інфікування таких продуктів *Enterobacter sakazakii* цілком покривається незрівнянно високим ступенем загрози, яку несе з собою проникнення збудника в організм чутливої до нього людини. Тому процедура виявлення *Enterobacter sakazakii* в сухих дитячих молочних сумішах передбачає значно ширший план відбору (sampling plan) — дослідження в 6 разів більшого, порівняно з іншими продуктами, числа паралельних проб [31].

Регламентація в харчових продуктах

У країнах Європейського Союзу *Enterobacter sakazakii* не допускається в 10 г жодної з 30 паралельно досліджених проб сухих розчинних молочних сумішей для дітей молодше 6 місяців [31]. Мікробіологічні дослідження на *Enterobacter sakazakii* мають проводитись паралельно з визначенням бактерій родини *Enterobacteriaceae* і незалежно від їх виявлення в продукті. Європейська повноважна установа з безпеки харчових продуктів (European Food safety Authority) 24 січня 2007 року констатувала відсутність кореляції між виявленням *Enterobacteriaceae* та *Enterobacter sakazakii* та бактерій роду *Salmonella* в дитячих молочних сумішах. Тому положення попереднього

Регламенту Євросоюзу [24] щодо можливості проведення досліджень на *Enterobacter sakazakii* тільки у випадках виявлення бактерій родини Enterobacteriaceae, на даний час скасовано [31]. Але зауважено, що на рівні окремих підприємств-виробників харчової продукції така кореляція може існувати. В разі надання компетентним контролюючим органам вірогідної інформації про встановлення зв'язку між виявленням ентеробактерій та *Enterobacter sakazakii* на даному виробництві може бути дозволено (під відповідальність власників підприємства) не проводити досліджень зразків продукції на *Enterobacter sakazakii*, якщо попередньо в них не було виявлено ентеробактерій (в 10 г кожної з 10 проб) [31].

Запобіжні заходи

За існуючої технології неможливо забезпечити промислову стерильність сухих молочних сумішей. Хоча в процесі приготування вони піддаються термічній обробці, але за температурою та експозицією вони поступаються параметрам стерилізації рідких (готових до вживання) молочних сумішей. Тому Федеральна Адміністрація з харчових продуктів та ліків США [32] наполягає на тому, що для харчування недоношених новонароджених слід використовувати лише рідкі, готові до вживання (стерилізовані) молочні суміші. Якщо ж стерильних сухих сумішей немає, то ризик захворювання може бути зменшений завдяки:

- застосуванню води з підвищеною температурою (70 — 90°C) для відновлення сухих молочних сумішей з наступним зберіганням за температури не більше 10°C (при тому можливі негативні наслідки — утворення грудок при гомогенізації суміші, втрата корисних властивостей термолабільних компонентів, активація бактеріальних

спор) або ж пастеризацією відновлених сумішей текучою парою (рекомендується обладнати приміщення для приготування сумішей стерилізаторами Коха);

- приготуванню невеликих порцій відновлених сумішей, призначених на одне вживання, з метою зменшення кількості та часу перебування при кімнатній температурі або в холодильнику;
- мінімізацією проміжку часу між приготуванням (відновленням) сухої суміші та її вживанням (не більше 4-х годин) [33];
- недопущенню перехресної контамінації з об'єктів довкілля та з обладнання;
- своєчасному вилученню неспожитих залишків відновлених молочних сумішей;
- індивідуалізацією вимог до процедури приготування молочних сумішей в кожному конкретному пологовому будинку залежно від його особливостей;
- навчання медичного персоналу та батьків правилам безпечного приготування, зберігання та вживання сухих молочних сумішей;
- розміщенню на етикетках сухих молочних сумішей докладної інформації щодо безпечного використання продукту та можливих загроз здоров'ю в разі недодержання згаданих вимог;
- лабораторному контролю за вмістом *Enterobacter sakazakii* в сухих молочних сумішах на всіх етапах їх виробництва, а також в об'єктах довкілля на підприємствах по виробництву сухих молочних продуктів для немовлят та в пологових будинках (відділеннях інтенсивного догляду за недоношеними новонародженими);
- аналізуванню та узагальненню епідеміологічних даних на регіональному та національному рівнях.

ЛІТЕРАТУРА

1. CDC. *Enterobacter sakazakii* infections associated with the use of powdered infant formula / CDC-Tennessee, 2001 MMWR// Morb. Mortal Weekly Rep. — 2002. — 51(14). — P. 298 — 300.
2. Lehner A. *Cronobacter* spp. in baby food: occurrence, significance and risk management / A.Lehner // Режим доступу: www.asuder.Org.tr.WDS 2009. — Presentation. — 1 — 30.
3. *Enterobacter sakazakii* — a new species of Enterobacteriaceae isolated from clinical specimens / [J.J.Farmer, M.A.Asbury, F.W. Hickman, D.J.Brenner] // Int.J. Syst. Bacteriol. — 1980. — 30. — P. 569 — 584.
4. *Enterobacter sakazaki* [ed. by J.Farber, S.Forsythe]. — Wasnigton DC: ASM Press. — 2008. — 271 p.
5. *Enterobacter sakazakii* and other microorganisms in powdered infant formula./ WHO. — MRA Series 6. — 2004.
6. Surveillance of oral cultures of Enterobacteriaceae during bone marrow transplantation / D.Galili, N.Tagger, M.N.Sela [et al.]// Oral Oncol. — 1995. — 31/ — P. 58 — 62.
7. Epidemiological typing of *Enterobacter sakazakii* in two neonatal nosocomial outbreaks / N.C.Clark, B.C.Hill, C.M. O'Hara [et al.] // Diagn. Microbiol. Infect. Dis. — 1990. — 13. — P. 467 — 472.
8. Outbreaks of necrotizing enterocolitis associated with *Enterobacter sakazakii* in powdered milk formula / J.Van Acker, F.De Smet, G.Muyldemans [et al.]// J.Clin. Microbiol. — 2001. — 39. — P. 293 — 297.
9. Обнаружение *Enterobacter sakazakii* в детских сухих молочных продуктах / Н.Р. Ефимочкина, И.Б. Быкова, И.В. Барбер [и др.] // Вopr. детской диетологии. — 2005. — Т.3. — № 4. — С. 46 — 49.
10. Бергілевич О.М. Вивчення контамінації сирого збірного молока бактеріями родини Enterobacteriaceae і в тому числі *Enterobacter sakazakii* / О.М.Бергілевич // Вісник Сумського

- національного аграрного університету. Серія "Ветеринарна медицина". — 2010. — Вип. 3(26). — С. 5 — 9.
11. Marler B. About *Enterobacter sakazakii*. 30.10.2010 // Marler B. // Режим доступу: www.Foodpoisingjournal.com.
12. Erickson M. *Enterobacter sakazakii*: an emerging food pathogen / M.Erickson, L. Kornacki // режим доступу: www.pdfio.com/k-706181. — P. 1 — 8
13. Nazarowec-White. Thermal resistance of *Enterobacter sakazakii* in reconstituted dried-infant formula / Nazarowec-White and Farber J.M. // Lett. Appl. Microbiol. — 1997. — 24. — p. 9 — 13.
14. Iversen C. Risk profile of *Enterobacter sakazakii* an emergent pathogen associated with infant milk formula / C.Iversen, S.Forsythe // Trends Food Sci. Technol. — 2003. — 14. — P. 443 — 454.
15. Biofilm formation, extracellular polysaccharide production, and cell-to-cell signaling in various *Enterobacter sakazakii* strains: aspects promoting environmental persistence / A .Lehner, K.Riedel, L.Eberl [et al.] // J. Food Prot. — 2005. — 68. — P. 2287 — 2294.
16. Production of cellulose and curly fimbriae by members of the family Enterobacteriaceae isolated from the human gastrointestinal tract / X.Zogaj, . W.Bokranz, M.Nimtzt [et al.] // J.Food.Prot. — 2003. — 71. — P. 4151 — 4158.
17. Iversen C. The growth profile. Thermotolerance and biofilm formation of *Enterobacter sakazakii* grown in infant formula milk / C. Iversen, M.Lane, S.Forsythe // Lett. Appl. Microbiol. — 2004. — 38. — P. 378 — 382.
18. Milk and milk products. Detection of *Enterobacter sakazakii*: ISO/TS 22964:2006 IDF/RM 210:2006. — [first edition 01.02.2006]. — 2006. — 13 p.
19. Метод определения *Enterobacter sakazakii* в продуктах питания для детей раннего возраста: МУК 4.2.2428:2008. — Москва.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. — 2008. — 8 с.(нормативный документ Роспотребнадзора. Методические указания).
20. Joosten H. Development of a CEL-ISO horizontal standard method for detection of *Cronobacter* / H. Joosten // — 1-st. Int. Conf. On *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*), Jan. 22 — 23, 2009., Univ.College Dublin, Ireland. Режим доступу: www/cronobacter.com/speakers.pdf.
21. Wess C. Application and susceptibility of three commercial systems for detection of *Enterobacter sakazakii* in ready-to-eat vegetable salads / C.Wess, B.Becker, W. Holzapfel // Arch. Lebensmittelhyg. — 2005. — 56. — P. 34 — 38.
22. Characterization of a collection of *Enterobacter sakazakii* isolates from environmental and food sources / D.Drudy, M.O'Rourke, M.Murphy [et al.] // Int. J. Food Microbiol. — 2006. — 110. — P. 127 — 134.
23. Lehner A. 16S rRNA gene based analysis of *Enterobacter sakazakii* from different sources and development of PCR assay for identification / A.Lehner, T.Tasara, R.Stepan // BMC Microbiol. — 2004. — 4. — P. 43.
24. Commission Regulation (EC) № 2073/2005. — Official J. of the European Union. — 2005. — L338/1 — 25.(нормативный документ Евросоюзу. Регламент).
25. Real time PCR using TaqMan and SYBR green for detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula / Y.Liu, X.Cai, X.Zhang [et al.] // J. Microbiol. Methods. — 2006. — 65. — P. 21 — 31.
26. Heterotrophic bacterial populations in the mineral waters of thermal springs in Spain / M.D.de los Angeles Mosso, M.D.Delaraosa, C.Vivar [et al.] // J. Appl. Bacteriol. — 1994. — 77. — P. 370 — 381.
27. Friemann M. *Enterobacter sakazakii* in food and beverages (other than infant formula and milk powder) / M.Friemann // Int. J. of Food Microbiol. — 2007. — 116. — P. 110.
28. Hamilton J.V. Isolation of *Enterobacter sakazakii* from midgut of *Stomoxys calcitrans* / J.V. Hamilton, M.J. Lehana, H.R.Braig // Emerg. Infect. Dis. — 2003. — 9. — P. 1355 — 1356.
29. Antimicrobial resistance of bacterial organisms isolated from rats / [F.M.Gakuya, M.N. Kyule, P.B. Gathura, S. Kariuki] // East Afr. Med. J. — 2001. — 78. — P. 646 — 649.
30. *Enterobacter sakazakii* infection in the newborn / B.Bar-Oz, A.Preminger, O.Peleg [et al.] // Acta Paediatr. — 2001. — 90. — P. 356 — 358.
31. Commission Regulation (EC) № 1441/2007. — Official J. of the European Union. — 2007. — L 322/12-28 (нормативный документ Евросоюзу. Регламент).
32. Health professionals letter on *Enterobacter sakazakii* infections associated with use of powdered (dry) infant formulas in neonatal intensive care units / US FDA // 2002.режим доступу:[www.Fda.gov/Food/Food Safety/Product-specific Information/InfantFormula/Alwrts Safety Information/ ucm111299.htm](http://www.Fda.gov/Food/Food%20Safety/Product-specific%20Information/InfantFormula/Alwrts%20Safety%20Information/ucm111299.htm).
33. Bowen A.B. Invasive *Enterobacter sakazakii* disease in infants / A.B.Bowen, C.R. Braden // Emerg. Infect. Dis. — 2006. — 12(8). — P. 1185 — 1189.

Надійшла до редакції 28.02.2012