

Jakość mikrobiologiczna preparatów do żywienia niemowląt i małych dzieci ze szczególnym uwzględnieniem Enterobacteriaceae i *E. sakazakii*

LIDIA STASIAK-RÓŻAŃSKA, MONIKA GARBOWSKA*, ANNA BERTHOLD*,
IRENA MOLSKA*, JOANNA CIEPIELEWSKA-JANAS*

Zakład Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, *Zakład Biotechnologii Mleka
Katedry Biotechnologii, Mikrobiologii i Oceny Żywności Wydziału Nauk o Żywności SGGW,
ul. Nowoursynowska 159 c, 02-787 Warszawa

Stasiak-Różańska L., Garbowska M., Berthold A., Molska I., Ciepielewska-Janias J.

Microbiological quality of foodstuffs for infants and young children with special focus on Enterobacteriaceae family and *E. sakazakii*

Summary

The aim of the study was to determine the total count of microorganisms, as well as the total count of bacteria from the Enterobacteriaceae family and the presence of *Enterobacter sakazakii* in foodstuffs for infants and young children available in Poland. Sixty samples of foodstuffs for infants and young children available in the Warsaw market were examined. The foodstuffs were divided into three groups depending on the age of their intended consumers. Experimental samples were prepared in conformity with PN-EN ISO 6887:2000. Total counts of microorganisms in all the samples were made according to PN-93/A-86034/04 and the samples were examined for the presence of bacteria from the Enterobacteriaceae family according to PN-ISO 21528-2:2005. The presence of *Enterobacter sakazakii* was established in thirty selected samples according to PKN-ISO/TS 22964. The total count of bacteria in foodstuffs intended for infants aged 0 to 12 months did not exceed 10^3 cfu/g. In foodstuffs intended for children aged 9 to 12 months up to 3 years the highest bacterial count amounted to 10^5 cfu/g of the sample. Bacteria from the Enterobacteriaceae family were detected only in four samples, all of which were foodstuffs intended for children aged more than 9 months. None of the samples examined were found positive for *E. sakazakii* in 1 g. However, some strains of this genus do not produce yellow pigment in the conditions specified by PKN-ISO/TS 22964. Therefore, in order to increase the reliability of the results obtained, microbiological examinations should be supplemented with genetic analyses. The total bacterial counts in foodstuffs for young children aged more than 9 months were higher, which suggests that their microbiological quality was slightly inferior to that of foodstuffs for infants. The presence of bacteria from the Enterobacteriaceae family in a low percentage of the experimental samples (6.7%) of foodstuffs for young children may indicate reinfection in the course of their production.

Keywords: infant foodstuffs, Enterobacteriaceae, *Enterobacter sakazakii*

Żywność dla niemowląt i małych dzieci zaliczana jest do środków specjalnego przeznaczenia żywieniowego, stąd też powinna podlegać ostrym kryteriom mikrobiologicznym. Różnice między wymienionymi produktami a produktami przeznaczonymi dla dorosłych dotyczą ich składu, sposobu wytwarzania oraz pakowania (20). Wśród tych artykułów wyodrębnione zostały cztery grupy: środki spożywcze do początkowego żywienia niemowląt, środki spożywcze do dalszego żywienia niemowląt, środki spożywcze uzupełniające oraz dietetyczne środki spożywcze specjalnego przeznaczenia żywieniowego (17).

Preparat do początkowego żywienia niemowląt to środek spożywczy specjalnego przeznaczenia żywie-

niowego, pokrywający całkowite zapotrzebowanie żywieniowe przez pierwsze cztery miesiące życia. Natomiast preparat do dalszego żywienia niemowląt, to środek specjalnego przeznaczenia żywieniowego, stanowiący podstawowy płynny składnik stopniowo różnicującej diety, stosowany w żywieniu niemowląt powyżej czwartego miesiąca życia (19). Zgodnie z wymogami Unii Europejskiej, szczególnie dużą wagę przywiązuje się do zapewnienia żywności dla niemowląt pełnego bezpieczeństwa zdrowotnego. Ustawa o bezpieczeństwie żywności i żywieniu człowieka z dnia 25 sierpnia 2006 r. (19) określa wymagania i procedury niezbędne do zapewnienia bezpieczeństwa żywności, przestrzegania zasad higieny surowców i ma-

teriałów oraz wyrobów przeznaczonych do kontaktu z żywnością.

W obowiązującym rozporządzeniu Komisji (WE) nr 1441/2007 z dnia 5 grudnia 2007 r. (16) w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dotyczących środków spożywczych ujęte są w ramach kryteriów bezpieczeństwa żywności oraz kryteriów higieny procesu wymagania wobec żywności dla niemowląt oraz preparatów specjalnego przeznaczenia medycznego. Za kryterium bezpieczeństwa żywności obowiązujące dla preparatów w proszku do początkowego żywienia niemowląt oraz żywności dietetycznej w proszku specjalnego przeznaczenia medycznego przeznaczonej dla niemowląt w wieku do sześciu miesięcy uznano obecność *Enterobacter sakazakii*. Według powyższych kryteriów, drobnoustroj ten nie może być obecny w 10 g produktu wprowadzanego do obrotu oraz w ciągu całego okresu przydatności do spożycia. Uznaje się, że jakość produktu jest zadowalająca, jeżeli w 30 losowo wybranych 10-gramowych próbkach nie stwierdza się obecności *E. sakazakii*. Występowanie tych bakterii w co najmniej jednej próbce na 30 badanych wskazuje na niezadowalającą jakość produktu. Ujęte w rozporządzeniu (16) kryteria higieny procesu dla preparatów w proszku do początkowego żywienia niemowląt i żywności dietetycznej w proszku specjalnego przeznaczenia medycznego przeznaczonej dla niemowląt w wieku do sześciu miesięcy oraz preparatów w proszku do dalszego żywienia niemowląt przewidują, że bakterie rodziny *Enterobacteriaceae* nie mogą występować w 10 g badanego produktu.

Pałeczki należące do *Enterobacteriaceae* wywołują najczęściej na świecie zatrucie pokarmowych, związanych często z groźnymi powikłaniami. W ostatnim czasie wzrosło zainteresowanie bakteriami z gatunku *E. sakazakii* oraz zagrożenie nimi niemowląt i małych dzieci, stąd poświęcono mu w tym artykule szczególną uwagę.

Enterobacter sakazakii należy do rodziny *Enterobacteriaceae* (1). Jest względnie beztlenową, Gram-ujemną, nieprzetrwalnikującą pałeczką. Przez długi czas bakterie te uważano za wytwarzający żółty pigment *Enterobacter cloacae*, jednak analiza sekwencji genomowej wykazała zaledwie 51% podobieństwa między tymi gatunkami. Zaistniała zatem potrzeba wyodrębnienia nowego gatunku, który nazwano *E. sakazakii* (1, 6, 7, 9). *E. sakazakii* to patogen szczególnie niebezpieczny dla niemowląt. Jest przyczyną nekrotycznych zapaleń jelita i okrężnicy, sepsy oraz zapalenia opon mózgowych (4, 8). Infekcje wywołane przez *E. sakazakii* mogą prowadzić do ciężkich powikłań neurologicznych, np. wodogłowia oraz opóźnień w rozwoju układu nerwowego, a związana z nimi śmiertelność wynosi od 40% do 80% (7). Źródło zakażenia niemowląt przez *E. sakazakii* stanowią: mleko w proszku, kaszki oraz preparaty przeznaczone do żywienia niemowląt. Patogen ten był stwierdzony także

w szpitalach, w środowisku oddziałów położniczych (4). Izolowany był m.in. z butelek, w których podawano pokarm noworodkom, ze szczotek stosowanych do mycia tych butelek, a także z mikserów używanych do przygotowywania pokarmu (5, 11). *E. sakazakii* występuje również w szerokiej gamie produktów spożywczych, takich jak: ryż, warzywa, ser, kielbasy, herbaty oraz różnego rodzaju przyprawy (5).

Zainteresowanie *E. sakazakii* wzrosło gwałtownie po zidentyfikowaniu kilku przypadków zakażeń wywołanych przez ten drobnoustroj. Pierwszy przypadek zapalenia opon mózgowych spowodowany obecnością *E. sakazakii* (uznanego wówczas za *E. cloacae*) odnotowano w 1961 r. u noworodka urodzonego w 33. tygodniu ciąży (1, 18).

W ciągu ostatnich 48 lat nie odnotowano przypadku infekcji wywołanej przez *E. sakazakii* u dzieci powyżej trzeciego miesiąca życia. Niemniej zagrożenie występowaniem *E. sakazakii* w sproszkowanych odżywkach dla niemowląt pozostaje przedmiotem badań Światowej Organizacji Zdrowia (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>). Wagę tego problemu potwierdza fakt wprowadzenia wymagań odnośnie do występowania *E. Sakazakii* w żywności dla niemowląt (16).

Posiadana obecnie wiedza na temat czynników wirulencji *E. sakazakii* oraz mechanizmu warunkującego patogenność tego gatunku jest bardzo uboga. Wyniki jedyne jak dotąd eksperymentu przeprowadzonego w tym zakresie wskazują, że w mechanizm infekcji zaangażowane jest zewnątrz błonowe białkowe białko A (outer membrane protein A, OmpA(+)). Podane młodym szczurom doustne dawki zawierające *E. sakazakii* z aktywnym białkiem OmpA(+) wykazały zdolność tych bakterii do penetracji bariery mózgowej. Doświadczenie to dowiodło, że ekspresja bakteryjnego białka OmpA(+) jest konieczna do zasiedlenia przez *E. sakazakii* przewodu pokarmowego, namnożenia się we krwi i w konsekwencji do wywołania zapalenia opon mózgowych (8). W leczeniu chorób spowodowanych przez *E. sakazakii* stosuje się obecnie terapię antybiotykową z wykorzystaniem ampicyliny lub gentamycyny, jednak wiele szczepów nabyło oporność na działanie tych leków i walka z tym patogenem staje się coraz trudniejsza (5).

E. sakazakii jest oporny na zakwaszenie i alkalizację środowiska oraz na drastyczne zmiany temperatury (10). W celu ograniczenia występowania *E. sakazakii* w żywności zaleca się stosowanie promieni gamma lub bakteriofagów (5), a także zaostrzenie i bezwzględne przestrzeganie zasad dobrej praktyki produkcyjnej i higieny produkcji (4).

Celem badań było określenie ogólnej liczby drobnoustrojów, liczby bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* oraz obecności *Enterobacter sakazakii* w produktach dostępnych na polskim rynku, przeznaczonych do żywienia niemowląt i dzieci.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na 60 próbkach preparatów do żywienia niemowląt i małych dzieci, dostępnych na rynku warszawskim. Pierwszą grupę stanowiły preparaty dla niemowląt w wieku od 0 do 4. miesiąca (15 próbek), drugą, produkty przeznaczone dla niemowląt od 4. do 12. miesiąca życia (27 próbek), trzecią – produkty żywnościowe dla dzieci w wieku od 9.-12. miesiąca życia do 3 lat (18 próbek).

Próbki do badań przygotowano zgodnie z PN-EN ISO 6887:2000 (14). We wszystkich próbkach oznaczono ogólną liczbę drobnoustrojów wg PN-93/A-86034/04 (13) oraz obecność bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae*. Badanie wykonano wg PN-ISO 21528-2:2005 (15).

Obecność *Enterobacter sakazakii* oznaczono zgodnie z Polską Normą PKN-ISO/TS 22964 (12) w 30 próbkach preparatów do żywienia niemowląt i małych dzieci.

Wyniki i omówienie

W próbkach przeznaczonych dla pierwszej grupy niemowląt brak drobnoustrojów w 0,1 g produktu stwierdzono zaledwie w dwóch próbkach (13%) na 15 badanych, pochodzących od tego samego producenta. Ogólna liczba drobnoustrojów (OLD), mieszcząca się w zakresie 10^0 - 10^1 jtk/g próbki, występowała w siedmiu produktach pochodzących od różnych producentów. OLD mieszcząca się w przedziale 10^1 - 10^2 jtk/g stwierdzono w 13% próbek, natomiast najwyższą OLD, w zakresie 10^2 - 10^3 jtk/g – w 27% próbek (ryc. 1).

Wśród 27 produktów przeznaczonych dla niemowląt od 4. do 12. miesiąca życia w 5 (18,5%) nie stwierdzono obecności drobnoustrojów w 0,1 g, przy czym 4 z tych próbek pochodziły od tego samego producenta i był to ten sam producent, w przypadku którego nie stwierdzono obecności drobnoustrojów w produktach przeznaczonych do żywienia najmłodszych niemowląt. OLD dla 10 zbadanych produktów (17%) mieściła się w zakresie 10^0 - 10^1 jtk/g próbki (37%), natomiast w 11 próbkach (18%) odnotowano OLD rzędu

10^1 - 10^2 jtk/g próbki (41%). Największe zanieczyszczenie mikrobiologiczne w tej grupie ($2,5 \times 10^3$ jtk/g) wykazano w jednej próbce, pochodzącej od producenta, w przypadku którego nie stwierdzono obecności drobnoustrojów w innych badanych produktach grupy drugiej.

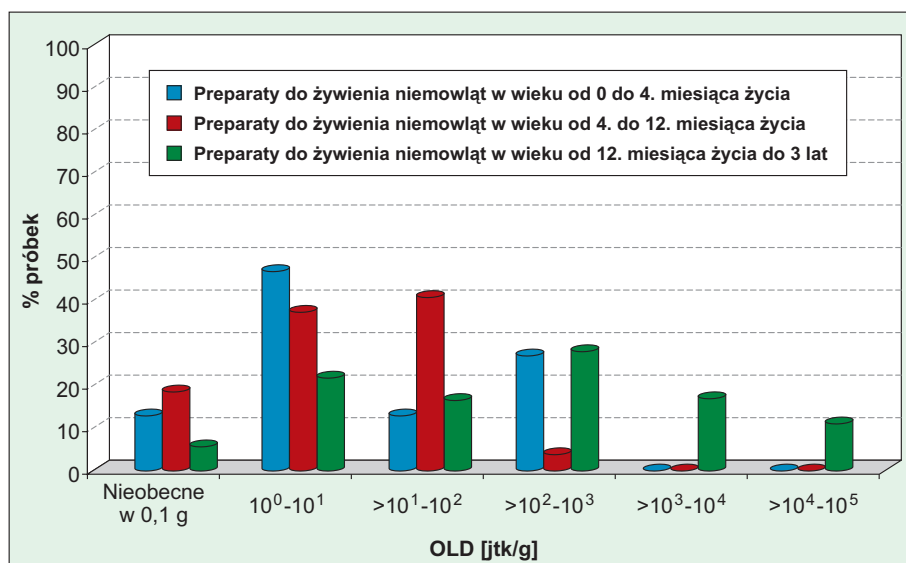
W grupie produktów przeznaczonych dla małych dzieci zanieczyszczenie mikrobiologiczne było największe. Wśród 18 przebadanych produktów obecności drobnoustrojów w 0,1 g nie stwierdzono tylko w jednej próbce (5,5%). W 22% próbek tej grupy od dwóch producentów wykazano OLD w zakresie 10^0 - 10^1 jtk/g, a w 16,5% OLD wynosiła 10^1 - 10^2 jtk/g. Pięć produktów (28%) charakteryzowało się OLD w granicach 10^2 - 10^3 jtk/g (28%). Największe zanieczyszczenie, rzędu 10^3 - 10^4 jtk/g (17%), wykazano w 3 produktach (17%), a 10^4 - 10^5 jtk/g w 2 (11%) produktach przeznaczonych do żywienia starszych dzieci.

Obecność bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* w 10 g stwierdzono tylko w 4 próbkach. Trzy z nich były preparatami dla dzieci najstarszych, natomiast jedna pochodziła z produktów grupy drugiej. Preparaty te pochodziły od dwóch producentów, w tym jednego, w przypadku którego produkty grupy pierwszej charakteryzowały się najwyższą czystością mikrobiologiczną.

Równoległe do badania zanieczyszczenia pałeczkami z rodziny *Enterobacteriaceae* wykonano oznaczenie obecności *E. sakazakii*. Po wstępnych etapach namnażania i posiewu na pożywkę chromogenną jedynie w przypadku 2 próbek odnotowano wzrost zabarwionych na zielono kolonii, jednakże w dalszych etapach identyfikacji tych bakterii na podłożu TSA wykluczono ich przynależność do oznaczanego gatunku (brak zdolności tworzenia żółtego pigmentu). Wyniki przeprowadzonych dla tych izolatów testów API 20 E także potwierdziły brak obecności *E. sakazakii* w badanych próbkach produktów rynkowych.

Po przebadaniu 60 próbek odżywek dla niemowląt i dzieci stwierdzono, że OLD w pierwszej oraz drugiej grupie produktów nie przekraczała 10^3 jtk/g. Wynik ten może być związany z obecnością bakterii ciepłopornych, występujących głównie w surowcach pochodzenia mlecznego oraz zbożowego. W trzeciej grupie produktów odnotowano największe zanieczyszczenie mikrobiologiczne, rzędu 10^5 jtk/g próbki. Zanieczyszczenie to może być wynikiem łagodniejszej obróbki termicznej tej grupy produktów w porównaniu z wcześniejszymi grupami.

W środkach spożywczych przeznaczonych dla najmłodszych dzieci nie stwierdzono obecności pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae*, co może



Ryc. 1. Ogólna liczba drobnoustrojów w preparatach dla niemowląt oraz produktach żywnościowych przeznaczonych dla małych dzieci

być związane z wysokimi standardami higieny produkcji. Obecność tych bakterii w jednej z próbek należących do drugiej grupy może wskazywać na reinfekcje mające miejsce w toku procesu technologicznego. Takie wnioskowanie wydaje się uzasadnione dla pozostałych trzech próbek z grupy trzeciej, w których również wykryto *Enterobacteriaceae*. Jak już wspomniano, badania mikrobiologiczne powinny być wykonane bezpośrednio po zakończonym procesie produkcji, nie zaś (tak jak w przypadku niniejszych badań) – w produktach rynkowych. Nie było jednak możliwości wykonania badań bezpośrednio po produkcji. Niemniej rozwój drobnoustrojów podczas przechowywania badanych środków spożywczych jest mało prawdopodobny ze względu na niską aktywność wody w tego rodzaju produktach.

Na podstawie wyników badań dotyczących wykrywania *E. sakazakii* można przypuszczać, że w wybranych do badań produktach do żywienia niemowląt nie występowały bakterie tego gatunku. Istnieje jednak ryzyko, że pewne szczepy *E. sakazakii* mogą nie wytwarzać żółtego pigmentu w warunkach badań zalecanych w Polskiej Normie (PKN-ISO/TS 22964) lub mogą stracić zdolność wytwarzania pigmentu podczas kolejnych przesiewów, a więc identyfikacja *E. sakazakii* na podstawie zdolności wytwarzania żółtego pigmentu na pożywce TSA nie jest wystarczająca. Jednocześnie najnowsze badania dowodzą, że nie istnieje jedna metoda, której zastosowanie pozwoliłoby jednoznacznie stwierdzić lub wykluczyć obecność *E. sakazakii*. Dlatego w celu zwiększenia prawdopodobieństwa otrzymywanych wyników zaleca się stosowanie metod łączących identyfikację mikrobiologiczną z analizą genetyczną.

Piśmiennictwo

1. Anon.: Enterobacter sakazakii infections associated with the use of powdered infant formula-Tennessee. MMWR Morb. Mortal Wkly Rep. 2001, 2002, 51, 297-300.
2. Brenner D. J., Krieg N. R., Staley J. T.: Garrity G. M.: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. T. 2, Springer, New York 2005, 661-669.
3. Cawthorn D. M., Botha S., Witthuhn R. C.: Evaluation of different methods for the detection and identification of Enterobacter sakazakii isolated from South African infant formula milks and the processing environmental. Int. J. Food Microbiol. 2008, 127, 129-138.
4. Fiore A., Casale M., Aureli P.: Enterobacter sakazakii: epidemiology, clinical presentation, prevention and control. Ann. Ist. Super Sanit. 2008, 44, 275-280.
5. Hunter C. J., Petrosyan M., Ford H. R., Prasadarao N. V.: Enterobacter sakazakii: an emerging pathogen in infants and neonates. Surg. Infect. (Larchmt) 2008, 9, 533-539.
6. Iversen C., Forsythe S.: Risk profile of Enterobacter sakazakii, an emergent pathogen associated with infant milk formula. Trends. Food Sci. Tech. 2003, 14, 443-454.
7. Korpysa-Dzirba W., Rola J. G., Osek J.: Enterobacter sakazakii – zagrożenie mikrobiologiczne w żywności. Medycyna Wet. 2007, 63, 1277-1280.
8. Mittal R., Wang Y., Hunter C. J., Gonzales-Gomez I., Prasadarao N. V.: Brain damage in newborn rat model of meningitis by Enterobacter sakazakii: a role for outer membrane protein A. Lab. Invest. 2009, 89, 263-277.
9. Nazarowec-White M., Farber J. M.: Enterobacter sakazakii: a review. Int. J. Food Microbiol. 1997, 34, 103-113.
10. Osaili T., Al-Nabulsi A., Shaker R., Ayyash M., Olaimat A., Abu Al-Hasan A., Kadora K., Holley R.: Effect of environmental stress on the sensitivity of Enterobacter sakazakii in powdered infant milk formula to gamma radiation. Lett. Appl. Microbiol. 2008, 47, 79-84.
11. Palcich G., Gillio Cde M., Aragon-Alegro L. C., Pagotto F. J., Farber J. M., Landgraf M., Destro M. T.: Enterobacter sakazakii in dried infant formulas and milk kitchens of maternity wards in São Paulo, Brazil. J. Food Prot. 2009, 72, 37-42.
12. PKN-ISO/TS 22964:2008. Mleko i przetwory mleczne. Wykrywanie Enterobacter sakazakii.
13. PN-93/A-86034/04. Mleko i przetwory mleczarskie. Badania mikrobiologiczne. Ogólna liczba drobnoustrojów – oznaczanie metodą płytkową w temperaturze 30°C.
14. PN-EN ISO 6887-1:2000. Mikrobiologia żywności i pasz. Przygotowanie próbek, zawiesiny wyjściowej i rozcieńczeń dziesięciokrotnych do badań mikrobiologicznych. Ogólne zasady przygotowania zawiesiny wyjściowej i rozcieńczeń dziesięciokrotnych.
15. PN-ISO 21528-2:2005. Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda wykrywania i oznaczania liczby Eneobacteriaceae. Część 2 – Metoda płytkowa.
16. Rozporządzenie Komisji (WE) nr 1441/2007 z dn. 5 grudnia 2007 r. w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dotyczących środków spożywczych.
17. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dn. 26 kwietnia 2004 r. w sprawie środków spożywczych specjalnego przeznaczenia żywieniowego (Dz. U. 04.104.1094).
18. Urmenyi A. M., Franklin A. W.: Neonatal death from pigmented coliform infection. Lancet. 1961, 1, 313-315.
19. Ustawa z dn. 25 sierpnia 2006 r. o bezpieczeństwie żywności i żywienia, opracowana na podstawie Dz. U. z 2006 r. nr 171, poz. 1225.
20. Weker H., Więch M.: Kryteria oceny żywności bezpiecznej dla dzieci. Żywnienie Człow. Metabolizm 2003, 30, 900-903.

Adres autora: mgr inż. Lidia Stasiak-Różańska, ul. Wereszczakówny 11A, 05-270 Marki; e-mail: lidkastasiak@interia.pl