

Міністерство освіти і науки України
Сумський державний університет

О. М. Бергілевич, В. В. Касянчук

**ТЕОРЕТИЧНЕ ТА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ
ОЦІНКИ МІКРОБІОЛОГІЧНОГО РИЗИКУ
*CRONOBACTER SPP. (ENTEROBACTER SAKAZAKII)***

Монографія

Рекомендовано вченою радою Сумського державного університету



Суми
Сумський державний університет
2018

Рецензенти:

М. Д. Чемич – доктор медичних наук, професор, завідувач кафедри інфекційних хвороб з епідеміологією Сумського державного університету;

В. Л. Коваленко – доктор ветеринарних наук, старший науковий співробітник Інституту ветеринарної медицини НААН України (м. Київ)

*Рекомендовано до видання
вченою радою Сумського державного університету
(протокол № 4 від 14 грудня 2017 року)*

Бергілевич О. М.

Б48 Теоретичне та експериментальне обґрунтування оцінки мікробіологічного ризику *Cronobacter spp. (Enterobacter sakazakii)* : монографія / О. М. Бергілевич, В. В. Касянчук. – Суми : Сумський державний університет, 2018. – 308 с.
ISBN 978-966-657-707-1

Монографія присвячена теоретичному та експериментальному обґрунтуванню оцінки мікробіологічного ризику щодо *Cronobacter spp. (Enterobacter sakazakii)*. Останні наукові дослідження міжнародного рівня свідчать про виникнення особливої небезпеки для дітей раннього віку, пов'язаної з уживанням дитячих сумішей, контамінованих мікроорганізмами з родини *Enterobacteriaceae* – *Enterobacter sakazakii (Cronobacter spp.)*.

У монографії узагальнено та детально наведено науково-методичні розробки авторів, результати власних наукових досліджень із вивчення оцінки мікробіологічного ризику *Enterobacter sakazakii (Cronobacter spp.)*. Узагальнені дані сучасної наукової літератури про екологію цього мікроорганізму, описані методи його виділення з досліджуваних об'єктів та принципи й критерії оцінки мікробіологічного ризику згідно з європейськими стандартами.

Cronobacter spp. – це нова назва мікроорганізму *Enterobacter sakazakii* згідно з рекласифікацією, наведеною в International Journal of Systematic and Evolutionary Biology та погодженою на 31-й сесії Комісії Кодекс Аліментаріус у 2008. Проте найчастіше в науковій літературі зазначають одночасно обидві назви збудника, тому в цій монографії використано одночасно як стару, так і нову назву мікроорганізму *Cronobacter spp. (Enterobacter sakazakii)*, або *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*.

Матеріал, наведений у монографії, буде корисним для спеціалістів, які працюють у сфері охорони здоров'я, громадського здоров'я, безпечності харчових продуктів та захисту прав споживачів, наукових та навчальних закладах, а також фахівців, зайнятих у сфері виробництва та мікробіологічного контролю харчових продуктів, аспірантів і студентів закладів вищої освіти.

Монографія написана на основі наукових досліджень, проведених у Сумському державному університеті.

УДК 616.34-008.87-053.31:613.22:579

ЗМІСТ

	С.
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ	4
ВСТУП	5
РОЗДІЛ 1 Загальна методологія оцінки мікробіологічного ризику	8
РОЗДІЛ 2 Ідентифікація небезпеки	13
РОЗДІЛ 3 Характеристика небезпеки	47
РОЗДІЛ 4 Оцінка експозиції (впливу)	137
РОЗДІЛ 5 Характеристика ризику	187
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	264

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

- АМР – аналіз мікробіологічного ризику
- БГКП – бактерії групи кишкової палички
- ВООЗ – Всесвітня організація охорони здоров'я
- ВРХ – велика рогата худоба
- ГОСТ – міждержавний стандарт
- ДСТУ – національний стандарт України
- ЗУ – закон України
- ЄС – Європейський Союз
- ККА – Комісія Кодекс Аліментаріус
- ККТ – критичні контрольні точки
- КМАФАНМ – кількість мезофільних аеробних та факультативно-анаеробних мікроорганізмів
- КТК – контрольні точки керування
- КУО – колонієутворювальна одиниця
- НБК – найбільш вірогідна кількість
- ОМР – оцінка мікробіологічного ризику
- ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція
- СОТ – Світова організація торгівлі
- ФАО – Всесвітня продовольча та сільськогосподарська організація ООН
- a_w – активність води
- Cronobacter spp. (E. sakazakii)* – *Cronobacter spp. (Enterobacter sakazakii)*
- FSO (Food Safety Objectives) – цілі щодо безпечності харчових продуктів
- НАССР – (Hazard Analysis Control Critical Points) – міжнародна система управління безпечністю харчових продуктів, що базується на аналізі небезпек та керуванні ризиками в КТК
- РС (Performance Criteria) – критерії виконання
- РО (Performance Objectives) – завдання або цілі виконання

ВСТУП

Оцінка мікробіологічного ризику (ОМР) є науковим компонентом у структурі аналізу ризику, що узагальнює існуючі наукові дані та новітню інформацію за результатами експериментів, щоб краще зрозуміти взаємодію мікроорганізмів, харчових продуктів і хвороб людини. ОМР сприяє оцінюванню ризику для здоров'я людини від мікроорганізмів у харчових продуктах та інструмент для управління цим ризиком. Здійснення ОМР, зокрема визначення кількісного значення цього показника, вимагає міждисциплінарного підходу.

Основним критерієм вибору пріоритетного мікроорганізму для ОМР, наведеним у цій монографії, були наукові дані вчених провідних країн світу та епідеміологічні дані, опубліковані в цих країнах, що свідчили про ризик *Cronobacter spp. (Enterobacter sakazakii)* для здоров'я людей та особливо дітей раннього віку за наявності цих мікроорганізмів у харчових продуктах та сухих дитячих сумішах. Крім того, вибір об'єкта досліджень був обумовлений тим, що в Україні відсутні наукові дані про цей патоген та немає обґрунтованих заходів ефективної профілактики, обумовлених цим мікроорганізмом харчових захворювань.

Cronobacter spp. (E. sakazakii) недавно підтверджений як патогенний мікроорганізм для немовлят. Перші повідомлення про ризик щодо виникнення захворювань, спричинених цим патогеном, були в 60-х роках ХХ ст. в країнах Європи, а в 70-х роках ХХ ст. – в США. У подальшому такі випадки почали виявлятися все частіше і в інших країнах світу. Наприкінці ХХ століття у Великобританії, Бельгії, Франції, США, Нідерландах траплялися випадки летальності серед новонароджених дітей з ознаками менінгіту, сепсису та некротичного ентероколіту, що пов'язують із уживанням сухих молочних сумішей для дитячого харчування, з яких було виділено умовно-патогенний мікроорганізм із родини *Enterobacteriaceae* – *Enterobacter sakazakii* [199, 244, 347, 395, 467].

Хвороби харчового походження є дуже поширеними серед інших захворювань, що призводять до людських страждань та створюють соціально-економічне напруження. Це дає підставу віднести їх до важливих проблем охорони громадського здоров'я. Експерти ФАО/ВООЗ віднесли немовлят віком менше ніж 12 місяців до категорії дітей найвищого ризику для виникнення захворювання, спричиненого *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*. Серед цих дітей найбільш уразливими вважаються немовлята віком до 28 днів, особливо ті, які передчасно народжені, й ті, що мають вагу менше ніж 2 500 грамів, та немовлята з імунодефіцитами до 2-місячного віку. Новонароджені від ВІЛ-позитивних матерів теж належать до категорії високого ризику, оскільки вони можуть потребувати особливо раннього вигодовування сухих молочних сумішей, а також більш сприйнятливі до збудника.

Згідно з повідомленнями експертів ФАО/ВООЗ вирізняють три категорії мікроорганізмів, що мали підтвердження безпосереднього зв'язку між їх наявністю в сухих молочних сумішах для дитячого харчування та захворюванням немовлят: (I) мікроорганізми, які є безпосередньою причиною захворювання, а саме: *Salmonella enterica* і *Enterobacter sakazakii*; (II) мікроорганізми, що можуть спричинити захворювання, але їх випадків не було виявлено, тобто вони належать до можливих збудників захворювань немовлят, виявлених у сухих молочних сумішах для дитячого харчування, а саме інші мікроорганізми родини *Enterobacteriaceae*; (III) мікроорганізми, які є найменш імовірною причиною виникнення захворювань у немовлят і які не можуть бути виявлені в сухих молочних сумішах для дитячого харчування, а саме: *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes* та *Staphylococcus aureus*.

Мікробіологічні небезпеки в харчових продуктах є основним фактором розповсюдження захворювань харчового походження в людини, і тому актуальність мікробіологічних досліджень щорічно зростає. *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* – це новий для України мікроорганізм, у плані внесення його до списку обов'язкових для індикації в харчових продуктах. На міжнародному

рівні цей мікроорганізм визнаний як небезпечний патоген, тому його виявлення є обов'язковим під час виробництва сухих дитячих сумішей. Контроль *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* повинен здійснюватися на усіх ланках виробничого процесу, починаючи із сировини, інгредієнтів, що входять до складу дитячих сумішей, та всіх об'єктів довкілля переробного підприємства, які можуть бути потенційними забруднювачами готового продукту.

Отже, враховуючи те, що *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* належить до патогенних мікроорганізмів і може спричиняти токсикоінфекції у людей та раптову смертність у немовлят віком до 6 місяців, актуальним та необхідним є написання наукової літератури, де будуть зазначені дані про цей збудник. Крім того, методологія ОМР досить давно та вдало використовується у світовій практиці для забезпечення здоров'я населення.

У монографії узагальнено та детально наведено науково-методичні розробки авторів, результати власних наукових досліджень із вивчення оцінки мікробіологічного ризику *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*. Узагальнено дані сучасної наукової літератури про екологію цього мікроорганізму, описано методи його виділення з досліджуваних об'єктів та принципи й критерії оцінки мікробіологічного ризику згідно з європейськими стандартами.

Матеріал, наведений в монографії, буде корисними для спеціалістів, які працюють у сфері охорони здоров'я, громадського здоров'я, безпечності харчових продуктів та захисту прав споживачів, наукових і навчальних закладах, а також фахівців, зайнятих у сфері виробництва та мікробіологічного контролю харчових продуктів, аспірантів і студентів вищих навчальних закладів.

РОЗДІЛ 1

ЗАГАЛЬНА МЕТОДОЛОГІЯ ОЦІНКИ

МІКРОБІОЛОГІЧНОГО РИЗИКУ

Проблема забезпечення безпечного харчування населення стала центральною й актуальною для всіх країн світу [32, 40, 49, 116, 413, 427]. Для України на сьогодні особливої актуальності набуло питання зближення національних підходів у галузі забезпечення безпеки харчових продуктів до сучасних міжнародних вимог [24, 33, 103, 122, 126, 131 – 134, 153, 449, 459].

Сучасними міжнародними вимогами встановлено декілька важливих принципів щодо забезпечення безпечності харчових продуктів, основним з яких є здійснення запобіжних та коригувальних заходів на основі наукової оцінки ризику [60, 113, 120, 121, 146, 415]. Іншим важливим принципом є забезпечення контролю впродовж харчового ланцюга [23, 27, 35, 90, 140, 156, 179].

Оцінка мікробіологічного ризику спрямована на вирішення тих проблем, які становлять найбільшу загрозу для здоров'я людини під час вживання харчових продуктів. ОМР необхідно здійснювати на науковій основі, а за результатами цієї оцінки здійснюються активні управлінські заходи. Крім того, підхід на основі оцінки ризику сприяє формуванню заощадливого та раціонального ставлення до ресурсів управління безпечністю харчових продуктів. ОМР використовують у системі НАССР для управління мікробіологічними небезпеками. Підхід на основі оцінки ризику передбачає розроблення заходів, нормативів, рекомендацій, стандартів відповідно до одержаних наукових даних щодо «ризиків» для здоров'я споживачів [451].

Наукова оцінка мікробіологічного ризику стосовно нових та маловивчених мікроорганізмів – це ключ для вдосконалення ветеринарно-санітарного контролю та запровадження адекватних санітарно-гігієнічних заходів під час виробництва продовольчої сировини і харчових продуктів [114, 147, 177, 178, 371]. На жаль, на сьогодні на національному рівні у практиці

ветеринарно-санітарного контролю не використовують такий новий міжнародний методологічний підхід, як ОМР.

Згідно з рекомендаціями ФАО/ВООЗ та Комісії Кодекс Аліментаріус ОМР вважається систематизованою об'єктивною оцінкою взаємозв'язаних наукових даних, призначених для використання з метою зниження негативного впливу певного мікроорганізму на здоров'я людини [177, 178, 208, 427, 428]. ОМР особливо важливе для вивчення нових патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів у продовольчій сировині й харчових продуктах. ОМР має свої особливості та методологічні підходи.

Методологічною основою цієї монографії були принципи та критерії ОМР, визнані на міжнародному рівні, що містили чотири структурні елементи (рис. 1).

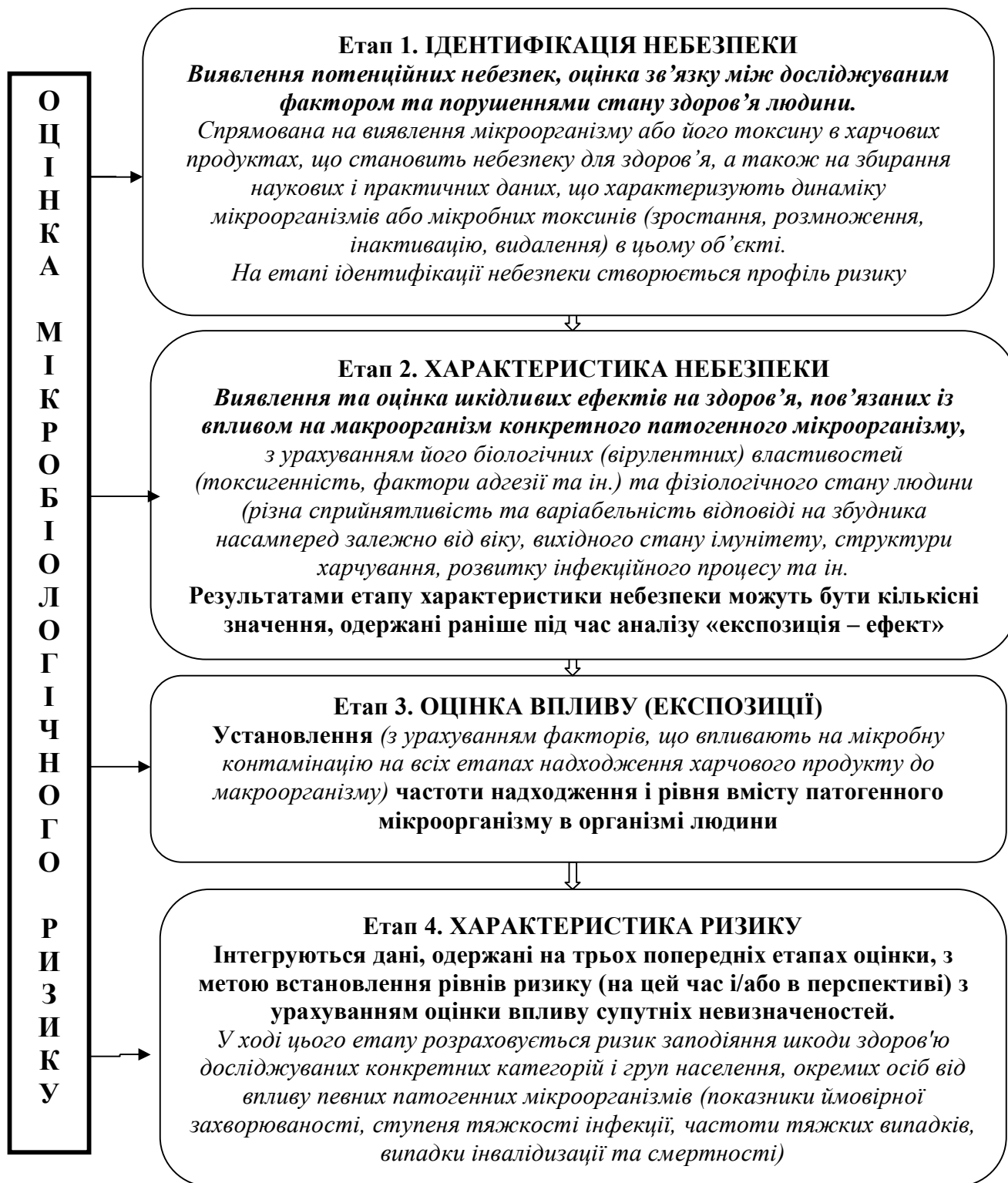


Рисунок 1 – Загальна схема методології оцінки мікробіологічного ризику

Отже, методологія та алгоритм дій стосовно установлення ОМР базується на загальноприйнятих міжнародних вимогах із використанням таких чотирьох складових: 1) ідентифікації небезпеки; 2) визначення характеристик небезпеки;

3) оцінка впливу (експозиції) та 4) визначення характеристик ризику. Характеристика ризику є завершальним підсумовувальним етапом, на якому вимальовується цілісна картина щодо ОМР [1, 2].

Нижче наведено таблицю, в якій визначено відмінності у підходах до кожного з чотирьох компонентів оцінки мікробіологічного ризику як для сирого молока, так і для готового харчового продукту (табл. 1).

Таблиця 1 – Порівняльна характеристика змісту чотирьох компонентів оцінки мікробіологічного ризику для сировини та готового продукту

Компонент оцінки ризику	Алгоритм дій для встановлення оцінки ризику <i>Cronobacter spp. (E. sakazakii)</i>	
	сире молоко	готовий харчовий продукт
Ідентифікація небезпеки	Аналіз наукових повідомлень про мікробіологічний ризик та ідентифікація бактерій <i>Cronobacter spp. (E. sakazakii)</i> в сирому збірному молоці корів та на об'єктах молочних ферм	Аналіз епідеміологічних даних і наукових повідомлень про ризик та його основні характеристики
Характеристика небезпеки	Установлення взаємозв'язку <i>Cronobacter spp. (E. sakazakii)</i> з умістом загальної кількості бактерій та мікроорганізмів родини <i>Enterobacteriaceae</i>	Аналіз даних літературних джерел про кількість осіб, які захворіли, та кількість смертей, пов'язаних з уживанням молочних продуктів
Оцінка впливу	Дані про вплив чинників на контамінацію молока бактеріями <i>Cronobacter spp. (E. sakazakii)</i> та прогнозування його поведінки на зміну різних чинників	Аналіз епідеміологічних даних про перебіг захворювання в різних категоріях населення
Характеристика ризику	Конкретні дані про ступінь ризику від наявності різних кількостей бактерій <i>Cronobacter spp. (E. sakazakii)</i> залежно від рівня контамінування цим мікроорганізмом продукції в ланках виробництва молока. Визначення можливих шляхів зменшення контамінації молока цим мікроорганізмом	Оцінка ступеня ризику <i>Cronobacter spp. (E. sakazakii)</i> залежно від вмісту його в певному об'ємі готової до споживання продукції

Оцінку мікробіологічного ризику ми провели у повній відповідності до чинних міжнародних вимог, визначених Комісією з розроблення стандартів у сфері забезпечення якості та безпечності харчових продуктів Кодекс Аліментаріус, з особливостями, встановленими для продовольчої сировини тваринного походження.

РОЗДІЛ 2

ІДЕНТИФІКАЦІЯ НЕБЕЗПЕКИ

Ідентифікація небезпеки спрямована на виявлення мікроорганізму або мікробного токсину в харчових продуктах, що становить небезпеку для здоров'я, а також на збирання наукових і практичних даних, що характеризують динаміку мікроорганізмів або мікробних токсинів (зростання, розмноження, інактивацію, видалення) в цьому об'єкті. На етапі ідентифікації небезпеки створюється *профіль ризику*. Метою ідентифікації небезпеки є максимально повна характеристика про мікроорганізм або токсин.

Профіль ризику містить такі елементи:

1. Визначення сфери ризику (ідентифікація типу продукту; опис процесу виробництва; визначення потенційного ризику для споживачів; створення переліку всіх мікробних чинників, що впливають на здоров'я населення, характерних для харчового продукту; оцінка можливості впливу патогенних мікроорганізмів на здоров'я; аналіз існуючих стандартів для оцінки мікробіологічної небезпеки; опис установлених раніше ризиків серед різних верств населення).

2. Індикатори ризику (кількість мікроорганізму в харчовому продукті; кількість інфекційних захворювань, пов'язаних з інфікованим продуктом; показники розмноження мікроорганізму в харчових продуктах).

3. Аналіз основних елементів системи безпеки (моніторинг харчових продуктів; практика якісного виробництва; оцінка контрольних точок; стандартизація санітарних заходів; оцінка вжитих заходів щодо забезпечення безпеки продукту).

Профіль ризику повинен бути максимально деталізований для позначення зв'язку конкретних патогенних мікроорганізмів з основними джерелами їх надходження (наприклад, із певними видами харчових продуктів) та факторами, за яких ці мікроорганізми будуть концентруватися в даних джерелах. Для цього необхідно узагальнити відомості з адекватних джерел про

захворюваність на певну інфекцію та її наслідки, пов'язати їх із частотою споживання харчових продуктів й існуючими способами контролю.

Джерелами цієї інформації були дані наукової літератури, соціально-гігієнічного моніторингу, міжнародних організацій у сфері оцінки ризику здоров'я населення у разі впливу факторів мікробної природи, що містяться в харчових продуктах, крім того, можуть бути використані експертні оцінки, а також інформація про випадки подібних захворювань.

Загальні дані про екологію збудника. Більшість науковців схильні вважати, що природним джерелом існування бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) є вміст шлунково-кишкового тракту людини [478], тварин [360, 388], комах [283, 344, 390] та гризунів [270]. Тобто ці мікроорганізми є представниками нормальної мікрофлори ротової порожнини та кишківника людини і тварин. З виділеними фекаліями мікроорганізми потрапляють у ґрунт, де можуть зберігатися до 120 діб [248, 387], у воду [233, 356], на фрукти та овочі [204, 267, 302, 332]. Також цей мікроорганізм виділяють із сировини тваринного походження та різноманітних харчових продуктів, а саме: сирого молока, молочних продуктів (сир, масло), сухого молока, м'яса та м'ясних продуктів (сосиски), фруктів, спецій, напоїв [241, 267, 302, 338, 346, 357, 425].

Проте в наукових працях Н. L. Muytjens та L. A. Kollee (1990) повідомляється про відсутність *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) в більшості природних об'єктів довкілля, а саме в поверхневих водах, залишках дерев, що згнили, ґрунті, зерні, фекаліях свійських тварин і птиці, сирому молоці корів [398]. Зведені дані про виявлення бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) в харчових продуктах та об'єктах довкілля і посилання на наукову літературу наведено в таблиці 2.1.

Таблиця 2.1 – Джерела виділення бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*)

Джерело виділення		Література
1		2
Клінічний матеріал	Від малюків з ознаками менінгіту	208, 226, 256, 259, 298, 361, 339, 395, 398, 401, 408, 465, 475
	Від малюків з ознаками сепсису (бактеріємії)	199, 226, 256, 257, 259, 361, 395
	Від малюків з ознаками некротичного ентероколіту	256, 259, 260, 298, 361, 449, 467
	Від дорослих з ознаками сепсису (бактеріємії)	244, 260, 286, 402
Харчові продукти	Сухі суміші для дитячого харчування	188, 199, 250, 255, 259, 260, 267, 297, 301, 302, 313, 325, 366, 371, 397, 400–403, 425, 449, 451
	Сухе молоко	188, 250, 297, 302, 325, 397, 434
	Масло вершкове	271
	Сир (твердий, м'який)	222, 249, 250, 302, 357, 440
	Сосиски та інші м'ясні вироби	192, 267, 357
	Риба та рибопродукти	384, 407
	Яйця	279, 394
	Овочі (свіжі та приготовлені)	204, 207, 267, 302, 325, 332, 357, 387, 434, 472
	Фрукти	267, 302, 332, 338, 361, 362, 420
	Спеції та сухі харчові інгредієнти	204, 267, 302, 313, 321, 342, 325, 387, 434
	Сухі трави та чай	313, 434
	Кондитерські вироби	204
	Морозиво	342
	Сировина	М'ясо, м'ясний фарш
Молоко		205, 225, 314, 341, 346, 361, 362, 410, 415, 432, 477
Птиця		317
Сухі злаки		325

Продовження таблиці 2.1

1		2
Напої	Вода	202, 220, 233, 258, 267, 356, 358, 415, 446
	Чай	458
	Соки	267, 332
Об'єкти переробних підприємств	Водопроводи	202, 415
	Обладнання	454
	Підприємства з виробництва сухого молока	232, 275, 277, 322, 325, 432, 451
Об'єкти довкілля	Домашнє обладнання (блендер, ложки, пляшечки та посуд для приготування дитячого харчування)	199, 209, 226, 313, 322, 387
	Середовище лікарні	375
	Ґрунт	248, 330
	Тваринний корм	370, 387
	Молочна ферма	219, 386–388
	Шкіра людини	325

Безперечним джерелом збудника інфекції є клінічний матеріал від хворих або загиблих малюків та дорослих. Бактерії *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) були виділені з різного клінічного матеріалу: спинномозкової рідини, кісткового мозку, крові, шкіри, поверхневих ран, респіраторного тракту (мокротиння, зі слизових носа і носоглотки), вмісту шлунково-кишкового тракту, сечі, калу [189, 199, 226, 237, 260, 347, 361, 467]. Цей мікроорганізм також був виділений з об'єктів лікарень [375].

R. Vuma та ін. (1999) виділили *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) з об'єктів молочної ферми [219]. С. Molloy та ін. (2008, 2009, 2010) вивчили об'єкти тваринницьких ферм, де утримувалися ВРХ та свині, як джерела потрапляння вищезазначених мікроорганізмів у продукти тваринного походження. За їх даними, мікроорганізми не було виділено з фекалій ВРХ, ґрунту ферми та води, але їх виділили з інших об'єктів, таких як тваринний корм, що свідчить про можливість потрапляння збудника в організм тварини. Пізніше цими авторами

було встановлено, що бактерії *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* виживали 105 діб у контейнерах для гноївки та 112 діб – у ґрунті. Тобто автори роблять висновок, що мікроорганізми здатні довготривалий час зберігатися в об'єктах молочної ферми, на що необхідно звернути увагу при одержанні молока-сировини [386–388]. S. A. Salmon та ін. (1998) ідентифікували бактерії *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* з виділень ураженої молочної залози у нетелів [443]. Y. Liu та ін. (2005), C. Molloy та ін. (2009) стверджують про наявність цих бактерій у кормах для тварин, а P. Skladal та ін. (1993) виділили їх із молочного обладнання під час виробництва молокопродуктів [370, 387, 454].

Поширення бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* в харчових продуктах та на об'єктах їх виробництва. Існує велика кількість наукових повідомлень про виявлення бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* з різних видів харчових продуктів: сирого молока та молокопродуктів (сухі молочні суміші для дитячого харчування, сухе молоко, сири, морозиво, масло), м'ясних продуктів, спецій, сухих трав, напоїв (вода, свіжі соки) та з рослинної продукції [267, 302, 326, 328, 332, 325, 338, 357].

Молоко та молочні продукти. Наукові дані стосовно наявності бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* в сирому молоці мають певні розбіжності. Перші відомості про спроби виділити їх із сирого молока наведені в наукових працях H. L. Muytjens та ін. (1990) [398]. Пізніше H. L. Muytjens (1990), H. M. Graven та ін. (2010), M. C. Kandhai (2010) подали результати своєї роботи щодо відсутності бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* в сирому коров'ячому молоці [275, 398]. В. М. Jayaro та L. Wang (1999) виділили ці бактерії із сирого збірного молока в 0,5 % випадків, одержаного з 130 молочних ферм США (штат Мінесота) [314]. За даними A. S. Norrakiah та ін. (2009), *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* були виділені в 63 % (n = 16) досліджених проб сирого молока та 13 % (n = 16) – проб пастеризованого [410]. Є й інші повідомлення про виявлення бактерії *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* із сирого молока [341, 346, 477].

Зведені дані щодо виявлення бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* в молокопродуктах наведено в таблиці 2.2.

Таблиця 2.2 – Виявлення бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* в молочних продуктах

Молочний продукт	Країна	Кількість досліджуваних проб (з яких відсоток позитивних)	Літературне джерело
Сире молоко			205, 314, 410
Пастеризоване молоко		82 (2,4 %)	361, 410
Сир	Великобританія		302
Сухе молоко	Нідерланди	170 (4,1 %)	296, 297
		175 (4 %)	325
	Великобританія	72 (4,2 %)	301–303
	Нігерія	50 (26 %)	188
Дитячі сухі суміші	Голландія	141 (14,2 %)	397
	Канада	120 (6,7 %)	401
	Нідерланди	40 (2,5 %)	296
		101 (2 %)	298
		395 (2 %)	325
	Великобританія	62 (62 %)	304
		58 (13,8 %)	366
	Йорданія	8 (25 %)	451
		15 (13,5 %)	
		69 (1,4 %)	313
Нігерія	70 (28,6 %)	188	
Японія	149 (24,2 %)	416	
Масло вершкове			271
Морозиво	Німеччина		342
Інші молочні продукти	Нігерія	20 (25 %)	188, 267

Більшість науковців вважають, що особливо епідеміологічно-небезпечними є сухі молочні суміші для дитячого харчування, в які бактерії *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* потрапляють або з контамінованою цим мікроорганізмом сировиною, або під час технологічного процесу (післяпастеризаційне контамінування, при додаванні інгредієнтів, що входять

до складу продукту, із доквілля (з повітря, з обладнання, у разі порушення умов пакування та зберігання)) або при порушенні гігієнічних правил під час приготування продукту до вживання в домашніх умовах чи на дитячих молочних кухнях [6, 14, 17, 97, 252–254].

За даними R.-G. K. Leuschner та ін. (2004) бактерії *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) були ідентифіковані з сухих молочних сумішей для дитячого харчування в 13,8 % випадків з 11 країн світу, серед яких Японія, Філіппіни, Таїланд, США, Австралія, Канада, В'єтнам та ін. [361].

За даними H. L. Muutjens (1988) під час дослідження 141 зразка сухих сумішей для дитячого харчування із 35 різних країн у 52,2 % випадків виявляли представників родини *Enterobacteriaceae*: у 25 % випадків – *E. agglomerans* (35 ізолятів), у 21 % – *E. cloacae* (30 ізолятів), у 14 % – *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) (20 ізолятів). Бактерії *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) були виділені із сухих сумішей для дитячого харчування кількістю від 0,36 до 66 КУО на 100 г із 20 представлених зразків із 13 країн [397].

За даними K. Onaka (2010), бактерії *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) були виділені із сухих сумішей для дитячого харчування у 24,2 % випадків із 12 країн світу (Японія, Філіппіни, Таїланд, США, Австралія, Канада, В'єтнам та ін.) кількістю від 0,36 до 0,91 КУО/100 г, а за даними V. P. Simmons та ін. (1989), – кількістю 8 КУО/100 г [416, 449]. G. Biering та ін. (1989) виявляли бактерії *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) із 5 різних видів упаковок сухих сумішей для дитячого харчування після випадку спалаху менінгіту у новонароджених в Ісландії [208].

Наявність *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) та інших представників родини *Enterobacteriaceae* наведена в працях C. Iversen та S. Forsythe (2004), в результаті яких було досліджено 82 зразки сухих сумішей для дитячого харчування та 404 зразки інших харчових продуктів, зокрема, сухе молоко, суха лактоза, різні види сирів, трави та спеції, інші свіжі та сухі продукти. Для виявлення *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) в продуктах були використані дві методики: FDA-метод (Food and Drug Administration method) [300] та DFI-метод

(Druggan-Forsythe-Iversen method) [304]. Останній метод базується на використанні нового хромогенного середовища DFI для ідентифікації даного виду бактерій. Результати показали, що з використанням DFI-методу позитивними на наявність бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* були 63 проби харчових продуктів із досліджуваних на відміну від FDA-методу, за якого лише 19 проб були позитивними. Згідно з висновком учених бактерії *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* були наявні в різних видах продуктів, але найчастіше в сухих молочних сумішах для дитячого харчування, сухому молоці та сухих продуктах.

У Росії перші повідомлення про виявлення бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* в продуктах для дитячого харчування науковцями лабораторії санітарно-харчової мікробіології та мікроекології Державного закладу Науково-дослідного інституту харчування Російської академії медичних наук м. Москви (ГУ НИИ питания РАМН) Н. Р. Єфімочкіною, І. Б. Биковою та С. А. Шевельовою та ін. з'явилися у 2005 році [53–55, 180–182]. Вони також детально вивчили культурально-біохімічні властивості, серед яких були виявлені такі, що є диференціальними для бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* від інших близькоспоріднених представників ентеробактерій. На основі проведених досліджень та ретельного аналізу діагностичного значення ряду фенотипічних тестів розроблена схема ідентифікації бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*, що вміщує розширену біохімічну ідентифікацію всіх культурально-морфологічних типів ізолятів [54, 94, 182].

Отже, *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* – мікроорганізм, що визнаний на міжнародному рівні як небезпечний патоген, і його визначення є обов'язковим під час виробництва сухих сумішей для дитячого харчування [27, 94, 120, 252–254].

М'ясо та м'ясні продукти. Крім молочних продуктів, ряд дослідників виділили бактерії *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* з м'яса різних видів тварин (свинини, яловичини) та птиці, а також м'ясних продуктів, виготовлених із цього м'яса [192, 267, 325, 357, 387, 402]. І. Watanabe та ін. (1994) виділили

бактерії *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* під час виробництва м'ясного фаршу та виробів із нього [471]. За іншими повідомленнями, яйця, риба та морепродукти теж містять цей збудник [279, 394, 384, 407].

Рослинні продукти. Останніми роками у світі збільшилася кількість випадків харчових отруєнь при вживанні свіжих овочів та фруктів, що пов'язують із наявністю на них бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* [204, 207, 267, 302, 325, 332, 361, 362, 387, 420, 434, 472]. Стурбованість викликає ще й те, що ці мікроорганізми зберігають здатність рости в охолодженій продукції, тим самим збільшують ризик інфекції для організму споживача та особливо споживача з ослабленим імунітетом [402].

А. Baumgartner та ін. (2009) дослідили 268 зразків продуктів із магазинів та супермаркетів на наявність у них бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*. Так, цей мікроорганізм був виділений у 14 із 23 зразків (60,9 %) свіжого салатного листя, паростків інших трав, у 7 із 26 зразків (26,9 %) спецій та інших сухих траві в 3 із 42 зразків (7,1 %) кондитерських виробів. Авторами було зроблено висновок, що продукти, які містять мікроорганізм, можуть стати джерелом потрапляння його в оселі споживачів [204].

Також бактерії *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* виявляли під час дослідження зерна пшениці, сої, листя рису, салату, цукрового буряку та продуктів, пов'язаних із ними [325, 327, 476].

Об'єкти довкілля та об'єкти переробних підприємств. Виявлення бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* у фекаліях людини та на поверхні шкіри свідчать про наявність цих мікроорганізмів в організмі людини, роблячи їх потенційним джерелом забруднення під час виробництва та приготування харчових продуктів [325, 361, 388].

Крім того, бактерії *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* можуть потрапляти в сировину під час приготування продуктів із водою, зокрема питною [58, 446], пилом [322] та повітрям [375]. Тому ці мікроорганізми необхідно розглядати як потенційні забруднювачі харчових продуктів упродовж харчового ланцюга їх виробництва.

С. Molloy та ін. (2009) вивчили об'єкти тваринницьких ферм, де утримували ВРХ та свиней, як джерела потрапляння цих мікроорганізмів до продуктів тваринного походження. За їх даними, бактерії *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* не було виділено з фекалій ВРХ, ґрунту ферми та води, але їх виділили з тваринного корму, що може свідчити про можливість потрапляння мікроорганізму в організм тварини [386, 388]. У працях Y. Liu та ін. (2005) теж наведено дані про наявність бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* в кормах для тварин [370].

Пізніше С. Molloy та ін. (2010) було встановлено, що бактерії *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* залишалися життєздатними впродовж 105 діб у контейнерах для гноївки та 112 діб – в ґрунті. Тобто автори роблять висновок, що мікроорганізми здатні тривалий час зберігатися в об'єктах молочної ферми, на що необхідно звернути увагу під час одержання молока-сировини [388].

P. Skladal та ін. (1993) і R. Vuma та ін. (1999) виявили бактерії *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* із різних об'єктів молочної ферми, зокрема з молочного обладнання [219, 454].

За даними Н. М. Graventa та ін. (2010) бактерії *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* не були виділені з об'єктів приймального пункту сирого молока, проте ці мікроорганізми виявляли в об'єктах заводу, що не задіяні в сушінні молока (взуття обслуговуючого персоналу, повітря в цехах). Отже, автори вважають, що важливими моментами в поширенні та потрапленні цих мікроорганізмів в сухе молоко під час технологічного процесу є рух повітря та пересування обслуговуючого персоналу. Одержані дані є дуже важливими для вдосконалення та впровадження нових стратегій гігієни виробництва, що значно зменшить ризик потрапляння бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* до готової продукції [275].

У Нідерландах упродовж п'яти років (із 2001 до 2005 року) М. С. Kandhai, А. Е. Neuvclink та ін. (2010) вивчали наявність бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* в різних об'єктах довкілля. За їх даними, ці бактерії були виділені із сухого молока (7/175), сухих сумішей для дітей до 1

року (8/395), сухих сумішей для дітей старше 1 року (1/5), інших сухих сумішей для дитячого харчування (1/182), сухого зерна (6/123), свіжого м'ясного фаршу (7/222), овочів (2/47), спецій (1/28), свіжих зразків фекалій людини (1/98), шкіри людини (1/116). Проте жодного разу бактерії не було виділено із сирого коров'ячого молока (0/51), людського (материнського) молока (0/7), дитячих пляшечок для годування (0/86), сосок для пляшечок для дитячого годування (0/95) [325].

Дослідження більшості авторів доводить, що бактерії *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) можуть бути виділені з широкого спектра сухих і тих, що містять вологу, харчових продуктів, окрім сухого дитячого харчування та сухого молока. Велике поширення цього мікроорганізму в об'єктах доквілля необхідно враховувати під час виробництва не лише сухого молока і сухих сумішей для дитячого харчування, а й інших харчових продуктів.

Серед можливих шляхів потрапляння бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) у харчові продукти їх природним резервуаром є комахи. Оскільки комахи є природним резервуаром мікроорганізму, вони також сприяють його поширенню в об'єктах доквілля.

Одними з перших, хто виділив бактерії *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) від комах, є L. V. Kuzina та ін. (2001). Із вмісту кишечнику мексиканської фруктової мухи *Anastrepha ludens* було виділено 18 різних видів мікроорганізмів із родин *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Vibrionaceae*, *Micrococcaceae* та інших. Поряд із такими видами мікроорганізмів, як *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonia*, були виділені штами *Enterobacter sakazakii*. Цікавим є те, що бактерії *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) найчастіше виділяли в молодих особин. Мексиканська фруктова муха паразитує на цитрусових та манго, що створює загрозу потрапляння бактерій на поверхню фруктів. Місце її існування Центральна Америка [334].

J. V. Hamilton та ін. (2003) було встановлено, що кишечник личинок хлівної мухи *Stomoxys calcitrans* є природним резервуаром бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*). Цей вид комах є кровосисним та досить

поширений в усьому світі. Географічне поширення хлівної мухи *Stomoxys calcitrans* збігається із зареєстрованими місцями виникнення інфекцій, пов'язаних із бактеріями *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*, – Данія, США, Німеччина, Ізраїль, Великобританія. Ці комахи харчуються кров'ю ВРХ, коней, свиней та людей, а також птиці. Природне місце існування хлівної мухи – це тваринницькі приміщення, що створює контамінацію сирого молока на фермі бактеріями *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* [283].

Існує також повідомлення, що домашня муха *Musca domestica* теж є природним резервуаром для бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*. Проте маловідомо, де саме в організмі знаходиться мікроорганізм (на поверхні тіла комахи чи у вмісті її шлунково-кишкового тракту).

За даними F. M. Gakuya та ін. (2001), в організмі щурів поряд із такими мікроорганізмами, як *Escherichia coli* (137 штамів), *Enterobacter cloacae* (4 штами), *Klebsiella pneumoniae* (2 штами), *Morganella morganii* (2 штами), *Pseudomonas aeruginosa* (2 штами) *Salmonella typhimurium* (1 штама), було виділено *Enterobacter sakazakii* (2 штами). Це свідчить про те, що ці тварини є природним резервуаром бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* і можуть сприяти їх поширенню в довкіллі [269].

Таким чином, із вищенаведених повідомлень із літературних джерел, можна зробити висновок про те, що комахи здебільшого є основним екологічним резервуаром для бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*, що сприяє поширенню мікроорганізмів в об'єктах довкілля. Це необхідно враховувати під час розроблення заходів контролю в процесі виробництва, зберігання та споживання харчових продуктів із метою запобігання виникненню та поширенню інфекції серед споживачів.

Шляхи контамінації сухих сумішей для дитячого харчування бактеріями *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*. За даними більшості авторів, епідеміологічно-небезпечними все ж таки є сухі молочні суміші для дитячого харчування. Шляхи потрапляння цих мікроорганізмів до сухих сумішей дуже

різноманітні, проте згідно із Всесвітньою організацією охорони здоров'я вирізняють три основні:

1) з неякісними або контамінованими цим мікроорганізмом сировиною та інгредієнтами, які використовують для виробництва сухих молочних продуктів для дітей;

2) під час технологічного процесу (післяпастеризаційне контамінування, із довкілля (з повітря, з обладнання), у разі порушення умов пакування та зберігання);

3) при порушенні гігієнічних правил під час приготування продукту до вживання в домашніх умовах чи на дитячих молочних кухнях [252, 253].

Схематично потенційні шляхи потрапляння *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* до сухих сумішей для дитячого харчування під час їх виробництва наведені на рисунку 2.1.

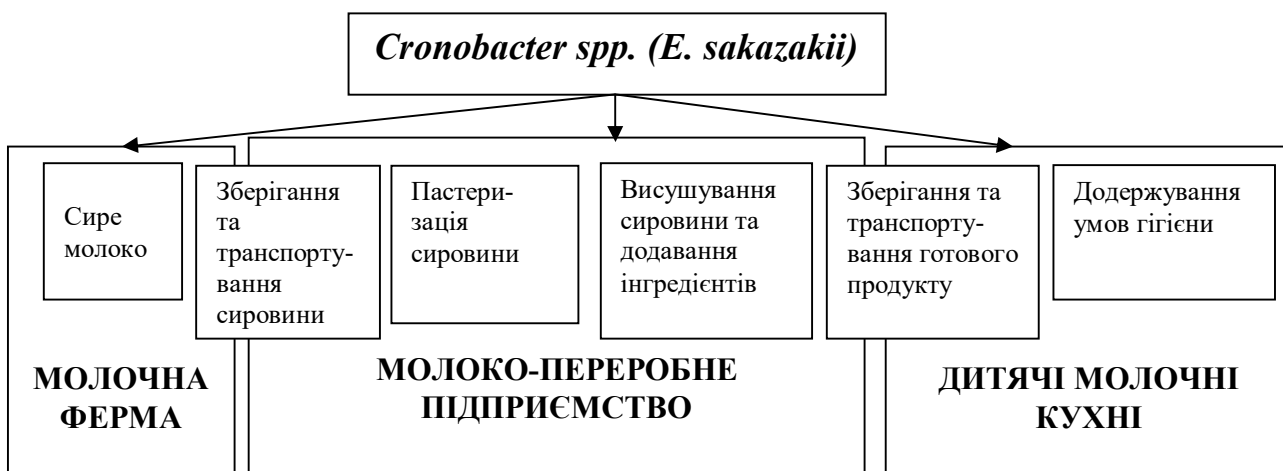


Рисунок 2.1– Схема потенційних шляхів контамінації сухих сумішей для дитячого харчування бактеріями *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* під час їх виробництва

За даними Н. М. Craven, С. М. McAuley та ін. (2010), бактерії *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* були виділені у 38 % випадків із 298 зразків,

відібраних на п'яти заводах з виробництва сухого молока. Найчастіше ці мікроорганізми були виділені з об'єктів, не задіяних у виробничому процесі (взуття обслуговуючого персоналу, повітря в цехах) (49 %), аніж з об'єктів, безпосередньо пов'язаних із виробництвом сухого молока (залівні танкери, випарювальна установка або розпилювальна сушка) (29 %). Цікавим є те, що бактерії *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* не були виділені із сирого молока та об'єктів приймального пункту, проте мікроорганізми виділяли з об'єктів заводу, задіяних у сушінні молока.

Отже, за висновками авторів, бактерії *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* дуже поширені в об'єктах заводів з виробництва сухого молока. Крім того, автори вважають, що важливими моментами в поширенні та потраплянні цих мікроорганізмів у сухе молоко під час технологічного процесу є рух повітря та пересування обслуговуючого персоналу. Одержані дані є дуже важливими для вдосконалення та впровадження нових стратегій гігієни виробництва, що значно зменшить ризик потрапляння бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* до готової продукції [275].

Крім того, доведено здатність бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* утворювати скупчення (біоплівки) на поверхні пластику та силікону. Тому ентеральні зонди, соски та пластикові пляшечки для годування дітей можуть містити велику кількість бактерій і сприяти виникненню хвороби [252, 253].

Із наведеного огляду літератури можна зробити висновок про те, що бактерії *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* – умовно-патогенний мікроорганізм, який був виділений у багатьох країнах світу та вважається небезпечним щодо виникнення у людей і, особливо, у дітей харчових отруєнь. Цей мікроорганізм був виділений із різних видів харчових продуктів та об'єктів довкілля. Що стосується його наявності у сирому молоці, то дані літератури кардинально протилежні. В одних випадках є свідчення про наявність цих мікроорганізмів у сирому молоці корів, а в інших – про відсутність. Тому це питання є принциповим щодо подальшого вивчення. Крім того, серед зазначених літературних джерел, на жаль, немає вітчизняних даних стосовно виявлення

бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* в Україні. Далі наводимо власні результати наших досліджень із цього питання.

Ідентифікація небезпеки стосовно бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* в харчовому ланцюгу виробництва молока. В Україні не встановлено нормативної вимоги до визначення мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* в харчових продуктах, але така вимога існує в країнах ЄС, США, Канаді та інших країнах.

Визначення мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* в сирому молоці є особливо актуальним для молока-сировини, що використовується для виробництва харчових продуктів для дітей. Показником мікробіологічної безпечності сирого молока в країнах ЄС є додержання виробником відповідності мікробіологічним критеріям щодо *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* та кількості мезофільних аеробних і факультативно-анаеробних мікроорганізмів (КМАФАнМ) [9, 10, 16, 379–383]. У цьому переліку показників мікробіологічної безпечності істотне значення для визначення придатності молока для виробництва молокопродуктів має встановлення співвідношення кількості *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* до загальної кількості мікроорганізмів.

Ураховуючи те, що Україна має намір експортувати молокопродукти в країни ЄС, актуальним є виконання вимог цих країн до якості та безпечності харчових продуктів. Першочерговою умовою для виробництва якісних та безпечних молочних продуктів є якісна й безпечна сировина. Молочна сировина вважається якісною та безпечною лише тоді, коли є гарантія попередження всіх можливих небезпек і особливо патогенних мікроорганізмів. Оскільки в національних нормативних документах не передбачено контролювання сирого молока на вміст мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae*, і зокрема роду *Enterobacter*, тому є актуальним проведення наукових досліджень щодо встановлення ступеня поширення цих мікроорганізмів у сирому молоці та об'єктах, що контактують із ним під час його виробництва [14, 16, 17, 21, 24].

Ідентифікацію небезпеки стосовно бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) в сирому збірному молоці корів спочатку проводили шляхом аналізування епідеміологічних та наукових даних, що існують у світі на цей час, із метою чіткого формування на національному рівні поняття про те, що цей мікроорганізм є небезпечним умовно-патогенним мікроорганізмом, який спричиняє харчове отруєння у новонароджених малюків.

Нижче наведено аналіз, що підтверджує ідентифікацію бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) як небезпечного мікроорганізму в сирому молоці. Вітчизняних даних стосовно характеристик бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) на сьогодні поки що немає, тому вони не наводяться в даному аналізі. Результати аналізу зарубіжної літератури щодо ідентифікації цих бактерій наведені порівняно з характеристиками ступеня небезпечності інших мікроорганізмів, які виділяють із сирого молока корів (табл. 2.3).

Таблиця 2.3 – Ідентифікація небезпеки стосовно бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) порівняно з іншими мікроорганізмами сирого молока [73, 264, 340, 422, 444]

Мікроорганізм	Потрапляє в молоко з вим'я	Потрапляє в молоко з довкілля	Витримує пастеризацію	Ризик від сирого молока	Ризик від молочних продуктів
1	2	3	4	5	6
<i>Aeromonas spp.</i>	–	+	–	Невисокий	+
<i>Bacillus cereus</i>	–	+	–	Середній	++
<i>Brucella spp</i>	+	+	–	Високий	+
<i>Campylobacter jejuni</i>	–	+	–	Невисокий	++
<i>Clostridium botulinum</i>	–	+	+	Високий	+
<i>Clostridium perfringens</i>	–	+	+	Середній	+
<i>Corynebacterium spp</i>	+	+	–	Невисокий	+
<i>Coxiella burnetti</i>	+	+	–	Невисокий	+

Продовження таблиці 2.3

1	2	3	4	5	6
<i>Cronobacter spp.</i> (<i>E. sakazakii</i>)	–	+	–	Високий	+
Патогенні <i>Escherichia coli</i>	–	+	–	Високий	++
<i>Listeria monocitogenes</i>	+	+	–	Високий	++
<i>Micobacterium avium</i>	–	+	–	Невисокий	–
<i>Micobacterium bovis</i>	+	+	–	Високий	++
<i>Salmonella spp.</i>	–	+	–	Невисокий	++
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+	–	Середній	++
<i>Streptococcus spp.</i>	+	+	–	Невисокий	+
<i>Yersinia enterocolitica</i>	–	+	–	Невисокий	+

Примітка: «+» – середній ризик, «++» – високий ризик, «–» – невисокий ризик

Як бачимо з табл. 2.3 і за даними такої відомої авторитетної організації, як міжнародна Комісія за мікробіологічними специфікаціями (International Commission on Microbiological Specification for Foods (ICSMF)), із 17 мікроорганізмів, що найбільш часто можуть виявлятися у сирому молоці корів, встановлено 5 мікроорганізмів із високим ризиком, серед яких бактерії *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* [340].

Визнання *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* небезпечним мікроорганізмом повинно супроводжуватися відповідним контролем та заходами управління. Як контроль, так і заходи управління певним небезпечним мікроорганізмом, залежать від того, які мікробіологічні критерії (вимоги) встановлені щодо нього. Мікробіологічні критерії до небезпечного мікроорганізму встановлюються залежно від виду харчових продуктів, де він імовірно може виявлятися. Особливо жорсткі мікробіологічні вимоги ставляться до сировини та продуктів для дитячого харчування. Стосовно бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*, що є особливо небезпечними для дітей, відповідність

мікробіологічним критеріям повинна особливо ретельно перевірятися. Крім того, основа здійснення санітарного контролю виробництва продуктів тваринництва полягає у визначенні небезпек у харчовому ланцюгу з основним акцентом на виробництво сировини. У зв'язку з цим ми акцентували увагу на оцінці ризику *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* в сирому молоці як у сировині для молокопереробних підприємств, оскільки саме воно є первинним об'єктом контролю в харчовому ланцюгу виробництва молокопродуктів.

Виявлення та ідентифікація мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* в молоці та в об'єктах молочної ферми. Для здійснення ідентифікації *E. sakazakii* в сирому молоці корів спочатку були проведені дослідження, що спрямовувалися на вивчення поширення мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* в молоці та об'єктах молочної ферми, оскільки зазначений мікроорганізм є представником цієї родини. Було досліджено 475 проб сирого збірного молока корів із молочних ферм із різною загальною кількістю мікроорганізмів (гатунок «екстра», «вищий», «перший» та «другий»). Результати наведені в табл. 2.4.

У таблиці 2.4 наведені дані щодо кількості позитивних проб в абсолютному та відносному значеннях за результатами їх досліджень на мікроорганізми родини *Enterobacteriaceae* та окремих їх представників.

Під час аналізу проб сирого збірного молока з різною мікробною контамінацією ми встановили, що частота виділення мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* зростає прямо пропорційно загальній кількості мікроорганізмів. Під час мікробіологічного дослідження проб сирого молока ми виділили таких представників мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae*: *Escherichia spp.*, *Salmonella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Proteus spp.*

Під час характеристики частоти виділення окремих представників родини *Enterobacteriaceae* було встановлено, що в сирому збірному молоці корів левову частку займають мікроорганізми роду *Escherichia spp.* (382 позитивні проби) та роду *Enterobacter spp.* – на 180 позитивних проб менше.

Таблиця 2.4 – Кількість позитивних проб сирого збірного молока корів, що містять мікроорганізми родини *Enterobacteriaceae*, залежно від гатунку молока (n = 475)

Гатунок молока	Кіль- кість дослі- джених проб	Абсолютна кількість позитивних проб, що містили мікроорганізми родини <i>Enterobacteriaceae</i> /відносна кількість, %			
		<i>Escherichia spp.</i>	<i>Enterobacter spp.</i>	<i>Salmonella spp.</i>	<i>Proteus spp.</i>
«Екстра»	75	48 (64 %)	25 (33,3 %)	–	–
«Вищий»	100	65 (65 %)	37 (37 %)	7 (7 %)	5 (5 %)
«Перший»	150	127 (84,7 %)	62 (41,3 %)	13 (8,7 %)	18 (12 %)
«Другий»	150	142 (94,7 %)	98 (65,3 %)	22 (14,7 %)	25 (16,7 %)
Разом	475	382 (80,4 %)	202 (46,7 %)	42 (8,8 %)	48 (10,1 %)

Під час детального лабораторного дослідження 475 проб сирого молока були одержані дані, що характеризують загальну кількість мікроорганізмів, кількісний вміст мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* та окремих їх представників. Ці дані наведені в табл. 2.5.

Як бачимо з таблиці 2.5, відсотковий вміст мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* в сирому збірному молоці корів у середньому становив від 19,9 до 48,9 % залежно від загальної кількості мікроорганізмів. Середнє відносне значення кількості мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* в складі загальної кількості мікроорганізмів молока сирого класу екстра становить 19,9 %, що в абсолютному значенні становить $(17,91 \pm 2,5)$ тис. КУО/см³. У молоці вищого гатунку ці значення становлять на 15,3 % і на $(80,7 \pm 9,5)$ тис. КУО/см³ більше. Найбільшу кількість мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* було виявлено в молоці другого гатунку, що порівняно з цим

показником у молоці гатунку екстра в середньому на 31 % більше (451,5 тис. КУО/см³). Причому найбільшу частку серед них становили два роди: *Escherichia spp.* та *Enterobacter spp.*

Таблиця 2.5 – Контамінація сирого збірного молока корів мікроорганізмами, в зокрема представниками родини *Enterobacteriaceae* (M ± m, n = 475)

Кількість досліджених проб	Загальна кількість мікроорганізмів, тис. КУО/см ³ (гатунок молока)	Мікроорганізм родини <i>Enterobacteriaceae</i> , тис. КУО/см ³				Кількість мікроорганізмів родини <i>Enterobacteriaceae</i> , тис. КУО/см ³
		<i>Escherichia spp.</i>	<i>Enterobacter spp.</i>	<i>Salmonella spp.</i>	<i>Proteus spp.</i>	
1	2	3	4	5	6	7
75	90 ± 12,8 (Екстра)	<u>3,6 ± 0,9</u> 20,0 %	<u>2,8 ± 0,5</u> 15,3 %	–	–	<u>17,91 ± 2,5</u> 19,9 %
100	280 ± 24,5 (Вищий)	<u>30,2 ± 0,1</u> 30,6 %	<u>25,1 ± 2,1</u> 25,5 %	<u>5,1 ± 0,9</u> 5,2 %	<u>4,6 ± 0,7</u> 4,7 %	<u>98,6 ± 12,0</u> 35,2 %
150	450 ± 42,7 (Перший)	<u>71,8 ± 0,5</u> 35,8%	<u>54,6 ± 8,3</u> 27,2 %	<u>14,9 ± 2,1</u> 7,4 %	<u>12,0 ± 1,9</u> 6,0 %	<u>200,7 ± 31,2</u> 44,6 %
150	960 ± 48,8 (Другий)	<u>177,8 ± 0,1</u> 37,9 %	<u>144,9 ± 9,1</u> 30,9 %	<u>39,9 ± 11,6</u> 8,5 %	<u>35,2 ± 1,7</u> 7,5 %	<u>469,4 ± 52,0</u> 48,9 %

Примітка: чисельник – кількість мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae*, тис. КУО/см³; знаменник – відсоток у колонках 3, 4, 5, 6, до кількості мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae*, а в колонці 7 – до загальної кількості мікроорганізмів

Було встановлено, що мікроорганізми роду *Enterobacter spp.* у сирому збірному молоці корів, у якому міститься до 100 тис. КУО/см³ від загальної кількості мікроорганізмів (гатунок молока екстра), перебувають у межах 15,3 % ((2,8 ± 0,5) тис. КУО/см³), у молоці вищого гатунку (загальна кількість мікроорганізмів до 300 тис. КУО/см³) – майже на 10 % більше, а в молоці із загальним умістом мікроорганізмів до 1 млн КУО/см³ – на 15 % більше.

Інші представники родини *Enterobacteriaceae* були виявлені в незначних кількостях. Так, у молоці гатунку «екстра» не було ідентифіковано представників родів *Salmonella spp.* і *Proteus spp.*

Отже, з підвищенням загальної кількості бактерій у сирому збірному молоці збільшується кількість мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae*, зокрема роду *Enterobacter spp.*

Оскільки при виробництві молока на молочних фермах існує небезпека потрапляння секрету вим'я від хворих на субклінічний мастит корів до загального надою, ми дослідили в ньому видовий склад мікроорганізмів і встановили відсоток мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* (рис. 2.2).

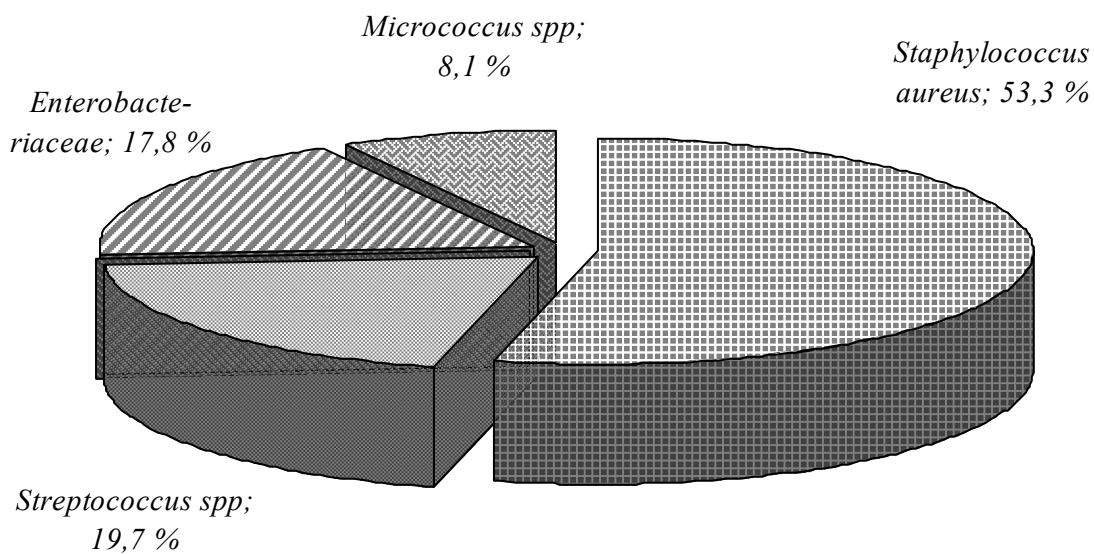


Рисунок 2.2 – Частота виявлення мікроорганізмів із секрету вим'я корів, хворих на субклінічний мастит (n = 153)

У цьому дослідженні ми не ідентифікували окремих представників родини *Enterobacteriaceae*, оскільки нашим завданням було встановити кількісне співвідношення мікроорганізмів даної родини в цілому до загальної

кількості мікроорганізмів. Ці дані нам були необхідні, для того щоб мати уявлення про величину потенційної небезпеки при випадковій контамінації збірного молока від хворих на субклінічний мастит.

Отже, при субклінічному маститі корів, мікроорганізми родини *Enterobacteriaceae* були виділені близько 17,8 % випадків порівняно з іншими мікроорганізмами, що виділялися при цьому захворюванні корів.

Як бачимо з рис. 2.2, найбільш часто із секрету вим'я корів, хворих на субклінічний мастит, виділяли *Staphylococcus aureus* (у 53,3 % випадків), на другому місці за частотою виділення були стрептококи (у 2,7 раз менше порівняно зі стафілококами), бактерії родини *Enterobacteriaceae* – в середньому втричі менше. Отже, секрет вим'я корів, хворих на субклінічний мастит, є одним із джерел контамінації сирого молока мікроорганізмами родини *Enterobacteriaceae*.

Надалі ми провели лабораторні дослідження проб секрету молочної залози корів, хворих на субклінічний та клінічний мастит. Одержані дані, що характеризують загальну кількість мікроорганізмів у пробах і вміст мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* та окремих їх представників, наведені в табл. 2.6.

Як бачимо з табл. 2.6, загальна кількість мікроорганізмів у секреті молочної залози від корів, хворих на субклінічний мастит, перебувала в межах близько $(320 \pm 1,2)$ млн КУО/см³. Серед загальної кількості мікроорганізмів кількість мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* була 17,8 %, або $(0,6 \pm 0,03)$ млн КУО/см³.

Загальна кількість мікроорганізмів у секреті молочної залози корів, хворих на клінічний мастит, у середньому була на $(350 \pm 1,5)$ млн КУО/см³ більшою порівняно із загальною кількістю мікроорганізмів у секреті молочної залози від корів, хворих на субклінічний мастит. Поряд із цим було відзначено виявлення більшої кількості мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* на 7,6 %, або більше ніж на 1,0 млн КУО/см³.

Найчастіше в усіх досліджуваних пробах серед загальної кількості мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* виділяли мікроорганізми родів *Escherichia spp.* та *Enterobacter spp.*

Таблиця 2.6 – Загальна кількість мікроорганізмів та мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* в пробах секрету молочної залози корів, хворих на субклінічну чи клінічну форму маститу ($M \pm m$, $n = 210$)

Форма маститу	Кількість досліджених проб	Загальна кількість мікроорганізмів, млн КУО/см ³	Мікроорганізм родини <i>Enterobacteriaceae</i> , тис. КУО/см ³				Кількість мікроорганізмів родини <i>Enterobacteriaceae</i> , млн КУО/см ³
			<i>Escherichia spp.</i>	<i>Enterobacter spp.</i>	<i>Salmonella spp.</i>	<i>Proteus spp.</i>	
1	2	3	4	5	6	7	8
Субклінічна	153	320 ± 32,6	$\frac{160,4 \pm 21,4}{33,2 \%}$	$\frac{145,0 \pm 20,2}{31,0 \%}$	$\frac{52,2 \pm 9,7}{10,6 \%}$	$\frac{66,8 \pm 10,2}{13,8\%}$	$\frac{0,6 \pm 0,03}{17,8 \%}$
Клінічна	57	670 ± 92,7	$\frac{732,8 \pm 39,1}{45,8 \%}$	$\frac{670,0 \pm 0,4}{41,9 \%}$	$\frac{240,0 \pm 27,1}{15 \%}$	$\frac{288,6 \pm 20,1}{18 \%}$	$\frac{1,6 \pm 0,2}{25,4 \%}$

Примітка: чисельник – кількість мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae*, тис. КУО/см³; знаменник – відсоток у колонках 4, 5, 6, 7 до загальної кількості мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae*, а в колонці 8 – до загальної кількості мікроорганізмів

Отже, мікроорганізми з родини *Enterobacteriaceae* виділяли з проб як сирого збірного молока, так і секрету молочної залози корів, хворих на субклінічний (17,8 % від загальної кількості мікроорганізмів) та клінічний мастит (25,4 %). Найчастіше в усіх досліджуваних випадках виділяли мікроорганізми родів *Escherichia spp.* та *Enterobacter spp.*

Тому можна зробити висновок, що потенційними джерелами потрапляння в сире збірне молоко корів мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* є секрет молочної залози корів, хворих на субклінічний.

Стан контамінації об'єктів молочних ферм мікроорганізмами родини *Enterobacteriaceae*. У результаті проведених лабораторних досліджень змивів з об'єктів молочної ферми були одержані дані, які характеризують загальну кількість мікроорганізмів та вміст мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* в них, що наведені в табл. 2.7.

Під час мікробіологічного дослідження змивів із шкіри вим'я корів встановлено, що загальна кількість мікроорганізмів у середньому становила ($40 \pm 2,8$) тис. КУО/см³. Видовий склад мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* в дослідних пробах змивів був представлений в основному *Escherichia spp.* (2,4 %) та *Enterobacter spp.* (2,1 %).

Під час мікробіологічного дослідження змивів зі шкірних покривів тіла корів кількість МАФАНМ була більшою у 23 рази, або в середньому на 820 тис. КУО/см³, порівняно з таким показником, визначеним у змивах із шкіри вим'я. При цьому 78,8 % припадало на загальну кількість мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae*, більшість з яких були представлені родами *Escherichia spp.*, *Enterobacter spp.* та *Proteus spp.*

У результаті мікробіологічних досліджень змивів із доїльних апаратів, молочних бідонів та молочних танків отримали такі дані: загальна кількість мікроорганізмів в усіх досліджуваних об'єктах була майже однаковою і в середньому становила від 42 до 45 тис. КУО/см³. Серед мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* у цьому випадку виділяли роди *Escherichia spp.*, *Enterobacter spp.* та *Salmonella spp.*

У результаті мікробіологічного дослідження рівня контамінації підлоги та повітря молочних ферм виявлено, що загальна кількість мікроорганізмів становила у середньому 2 343 і 1 784 тис. КУО/см³ відповідно, серед яких відносна кількість мікроорганізмів з родини *Enterobacteriaceae* була в межах 79 та 71,8 %. З одержаних результатів можна стверджувати, що підлога та повітря

молочної ферми теж є джерелами потрапляння мікроорганізмів, зокрема й мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae*.

Таблиця 2.7 – Контамінація об'єктів молочних ферм мікроорганізмами родини *Enterobacteriaceae* ($M \pm m$, $n = 190$)

Об'єкт досліджень	Кількість досліджених проб	Загальна кількість мікроорганізмів, тис. КУО/см ³	Мікроорганізм родини <i>Enterobacteriaceae</i> , тис. КУО/см ³				Кількість мікроорганізмів родини <i>Enterobacteriaceae</i> , тис. КУО/см ³
			<i>Escherichia spp.</i>	<i>Salmonella spp.</i>	<i>Enterobacter spp.</i>	<i>Proteus spp.</i>	
1	2	3	4	5	6	7	8
Змиви зі шкіри вим'я корів	25	40 ± 9,8	$\frac{0,1 \pm 0,01}{2,4 \%}$	$\frac{0,01}{0,5 \%}$	$\frac{0,1 \pm 0,01}{2,1 \%}$	$\frac{0,1 \pm 0,01}{0,6 \%}$	$\frac{2,2 \pm 0,1}{5,6 \%}$
Змиви зі шкірних покривів тіла корів	25	920 ± 32,7	$\frac{425,1 \pm 62,3}{33,8 \%}$	$\frac{34,1 \pm 5,1}{4,7 \%}$	$\frac{199,4 \pm 22}{27,5 \%}$	$\frac{92,8 \pm 18,2}{12,8 \%}$	$\frac{725 \pm 21,5}{78,8 \%}$
Змиви доїльних апаратів	40	45 ± 11,2	$\frac{0,1 \pm 0,01}{2,5 \%}$	$\frac{0,01}{0,4 \%}$	$\frac{0,1 \pm 0,01}{2,2 \%}$	–	$\frac{2,3 \pm 0,1}{5,1 \%}$
Змиви молочних бідонів	30	42 ± 13,7	$\frac{0,04}{2,2 \%}$	$\frac{0,01}{0,5 \%}$	$\frac{0,03}{2,1 \%}$	–	$\frac{2,01 \pm 0,1}{4,8 \%}$
Змиви з молочних танків	30	44 ± 14,5	$\frac{0,1 \pm 0,01}{2,8 \%}$	$\frac{0,01}{0,5 \%}$	$\frac{0,1 \pm 0,01}{2,4 \%}$	$\frac{0,01}{0,2 \%}$	$\frac{2,6 \pm 0,1}{5,9 \%}$
Змиви підлоги корівника	20	2343 ± 135,9	$\frac{592,3 \pm 65,1}{32 \%}$	$\frac{68,5 \pm 22,2}{3,7 \%}$	$\frac{564,6 \pm 65}{30,5 \%}$	$\frac{237 \pm 14}{12,8 \%}$	$\frac{1851 \pm 108,1}{79 \%}$
Повітря корівника	20	1784 ± 247,2	$\frac{395 \pm 43,9}{30,8 \%}$	$\frac{34,6 \pm 2,5}{2,7 \%}$	$\frac{352 \pm 31,1}{27,5 \%}$	$\frac{138 \pm 17,2}{10,8 \%}$	$\frac{1281 \pm 97,2}{71,8 \%}$

Примітка: чисельник – кількість мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae*, тис. КУО/см³; знаменник – відсоток у колонках 4, 5, 6, 7 до загальної кількості мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae*, в колонці 8 – до загальної кількості мікроорганізмів

Результатами наших досліджень встановлено, що мікроорганізми з родини *Enterobacteriaceae* виділяються з усіх об'єктів молочної ферми, проте їх кількість та вміст у загальній кількості мікроорганізмів відрізнявся. Найбільша

кількість мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* була встановлена у змивах із підлоги корівника (79 %), шкірних покривів тіла тварин (78,8 %) та в повітрі корівника (71,8 %). Меншою мірою мікроорганізми родини *Enterobacteriaceae* були виділені зі змивів молочного танка (5,9 %), шкіри вим'я корів (5,6 %), із доїльних апаратів (5,1 %) та молочних бідонів (4,8 %).

Одержані результати досліджень свідчать про те, що такі умовно-патогенні мікроорганізми з родини *Enterobacteriaceae*, як *Escherichia spp.* та *Enterobacter spp.*, досить часто і в значній кількості виділяються із сирого молока, секрету вим'я корів, хворих на субклінічний та клінічний мастит, і з об'єктів молочної ферми, що контактують із молоком.

Отже, згідно з нашими дослідженнями здоров'я дійних корів та санітарно-гігієнічний стан об'єктів молочної ферми істотно впливають на загальну кількість мікроорганізмів у сирому молоці й на кількісний склад мікрофлори родини *Enterobacteriaceae* в ньому.

Виявлення та ідентифікація бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* в сирому збірному молоці корів. У цьому підрозділі ми провели дослідження проб сирого молока щодо виявлення, ідентифікації та визначення кількості бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* в сирому збірному молоці корів. Результати проведеної роботи наведено в табл. 2.8.

Як бачимо з табл. 2.8, із 475 досліджуваних проб сирого збірного молока в 106 пробах, що становить 22,3 %, були виявлені бактерії *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*. Найбільша частота виявлення бактерій *Enterobacter sakazakii* була в пробах молока першого та другого гатунків, що становило 23,3 та 24,7 % позитивних проб у цій групі відповідно. Найменша частота виявлення бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* була в пробах молока гатунку «екстра», що становило 16 % від кількості позитивних проб молока гатунку «екстра».

Таблиця 2.8 – Кількість позитивних проб сирого збірного молока корів, що містять бактерії *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*, залежно від гатунку молока (n = 475)

Гатунок молока	Кількість досліджених проб	Кількість позитивних проб, що містили бактерії <i>Cronobacter spp. (E. sakazakii)</i>	
		абсолютна	відносна
«Екстра»	75	12	16 %
«Вищий»	100	22	22 %
«Перший»	150	35	23,3 %
«Другий»	150	37	24,7 %
Разом	475	106	22,3 %

Надалі ми вивчили частоту виявлення бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* в пробах сирого збірного молока впродовж 1 року (рис. 2.3). Як бачимо з рис. 2.3, найбільша частота виявлення проб сирого збірного молока корів, що містили бактерії *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*, була в літній та осінній періоди, а найменша – в зимовий і весняний періоди.

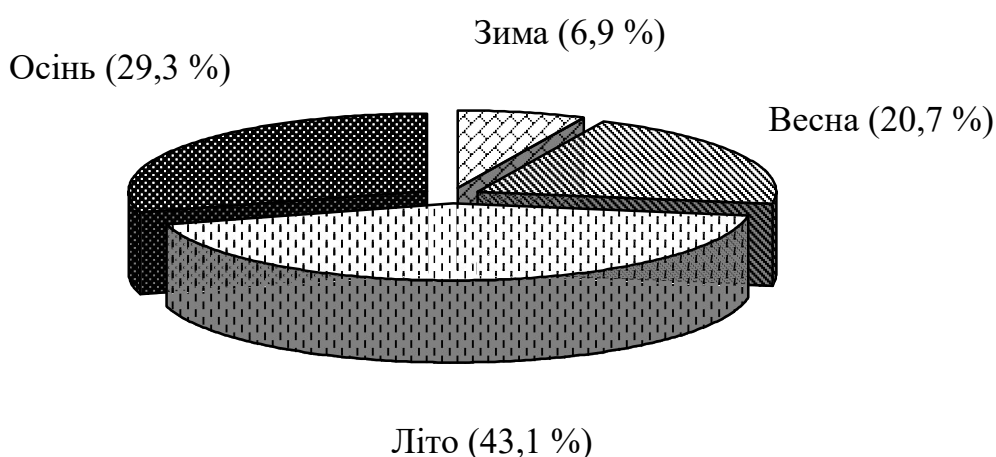


Рисунок 2.3 – Частота виявлення кількості позитивних проб молока, що містять бактерії *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*, впродовж 1 року (n = 475)

Нижче в табл. 2.9 наведені результати дослідження проб сирого збірного молока стосовно кількості бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* в них.

Таблиця 2.9 – Кількість бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* в пробах сирого збірного молока корів ($M \pm m$, $n = 475$)

Гатунок молока	Кількість бактерій <i>Cronobacter spp. (E. sakazakii)</i> в пробах, КУО/см ³		
	мінімальна	максимальна	середня
«Екстра»	17 ± 0,3	169 ± 22,4	124 ± 21,4
«Вищий»	480 ± 36,2	1270 ± 109,1	875 ± 98,4
«Перший»	980 ± 79,9	2980 ± 172,4	1984 ± 153,1
«Другий»	2345 ± 157,4	6700 ± 369,2	4753 ± 275,2

Як бачимо з табл. 2.9, кількість бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* була різною залежно від гатунку молока. Так, під час дослідження проб сирого збірного молока гатунку екстра мінімальна кількість бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* становила $(17 \pm 0,3)$ КУО/см³, а максимальна – $(169 \pm 22,4)$ КУО/см³ і більше. Найбільшою кількістю бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* порівняно з молоком гатунку екстра була в пробах молока другого гатунку і в середньому становила у 40 разів більше. Середня ж кількість бактерій *Enterobacter sakazakii* в пробах збірного сирого молока вищого та другого гатунків була $(875 \pm 98,4)$ та $(4753 \pm 275,2)$ КУО/см³.

Отже, бактерії *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* були виділені в пробах сирого збірного молока різного гатунку. Найбільша частота виявлення цих бактерій була в пробах молока другого (31 %) та першого (29,3 %) гатунків, а найменша – в пробах молока гатунку «екстра». Найчастіше ці мікроорганізми виділяли в пробах молока, отриманих в літньо-осінній період, рідше – в зимово-весняний. Кількість бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* в пробах молока

різних гатунків відрізнялася. Найбільшою їх кількість була в пробах молока другого гатунку, а найменшою – гатунку екстра.

Виявлення та ідентифікація бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* в секреті вим'я від корів, хворих на субклінічний мастит. Одним із поширених захворювань корів є мастит. Клінічно виражений мастит корів виявляється візуально, і такі корови не допускаються до доїння в збірне молоко. Субклінічний мастит не можна визначити за зовнішніми ознаками, і тому існує велика ймовірність потрапляння молока від хворих на субклінічний мастит корів до загального надою. Ми дослідили корів, які мали позитивну реакцію із швидким маститним тестом на наявність в їх секреті бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*. Результати проведеної роботи наведені в табл. 2.10.

Таблиця 2.10 – Кількість бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* в пробах секрету вим'я корів, хворих на субклінічний мастит ($M \pm m$, $n = 153$)

Кількість досліджених проб	Кількість позитивних проб, що містили бактерії <i>Cronobacter spp. (E. sakazakii)</i>		Кількість бактерій <i>Cronobacter spp. (E. sakazakii)</i> в пробах, тис. КУО/см ³		
	абсолютна	відносна	мінімальна	максимальна	середня
153	26	17,2 %	3,1 ± 0,1	8,7 ± 2,5	6,3 ± 1,2

Як свідчать дані табл. 2.10, із 153 досліджуваних проб секрету вим'я від корів, хворих на субклінічний мастит, 26 були позитивними щодо наявності бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*, що у відносному значенні становить 17,2 % випадків. У цих пробах мінімальною кількістю бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* була (3,1 ± 0,1) тис. КУО/см³, максимальною – на (5,6 ± 2,4) тис. КУО/см³ більше, а в середньому це становило (6,3 ± 1,2) тис. КУО/см³.

Отже, за результатами досліджень можна зробити висновок про те, що проби маститного молока у 47,2 % випадків містять бактерії *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) і створюють небезпеку потрапляння цих мікроорганізмів у сире збірне молоко корів під час його виробництва.

Виявлення та ідентифікація бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) в об'єктах молочних ферм. Мікробіологічні показники молока залежать від стану санітарних та гігієнічних параметрів об'єктів довкілля молочних ферм. Як свідчать дані літератури, найбільш вагомий вплив на мікробне забруднення молока мають санітарні показники таких об'єктів: шкіра вим'я та тіла корів, внутрішні поверхні доїльних апаратів, молочного посуду, молочного обладнання, підлога і повітря корівника.

Подальші наші дослідження були спрямовані на виявлення бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) саме в цих об'єктах молочних ферм. Результати дослідження наведені в табл. 2.11.

Як бачимо з табл. 2.11, у 25,3 % випадків бактерії *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) були виділені з різних об'єктів молочної ферми. Позитивними щодо наявності цих мікроорганізмів були проби змивів із підлоги корівника, шкірних покривів тіла тварин, змиви з доїльних апаратів (в основному гума доїльних стаканів) та змиви з молочного танка. Проте бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) не було виявлено у змивах із шкіри вим'я корів, молочних бідонів та в посівах повітря корівника.

Найбільша частота виявлення позитивних проб щодо бактерії *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) була під час дослідження змивів з підлоги корівника, що в середньому становило 45,5 % від загальної кількості виявлених позитивних проб, а найменшу кількість позитивних проб щодо бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) було виявлено серед змивів із молочного танка (15,2 %).

Таблиця 2.11 – Кількість бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* в об'єктах молочних ферм (n = 190)

Об'єкт досліджень	Кількість досліджених проб	Кількість позитивних проб, що містили бактерії <i>Cronobacter spp. (E. sakazakii)</i>	
		абсолютна	відносна
Змиви зі шкіри вим'я корів	25	–	–
Змиви зі шкірних покривів тіла корів	25	13	52 %
Змиви з доїльних апаратів	40	15	37 %
Змиви з молочних бідонів	30	–	–
Змиви з молочного танка	30	5	16,7 %
Змиви з підлоги корівника	20	15	75 %
Повітря корівника	20	–	–
Разом	190	48	25,3 %* (100 %)

Примітка: * – відсоток до загальної кількості позитивних проб

Крім факту виявлення бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* в об'єктах та довкіллі молочних ферм, що є звичайно само по собі дуже важливим, необхідно також визначати інтенсивність обсіменіння досліджуваних об'єктів цими бактеріями. Кількісна характеристика наявності певних мікроорганізмів на об'єктах, що безпосередньо впливають на показники мікробіологічної безпечності молока, характеризує рівень проведення санітарних заходів на фермі та спрямовує проведення коригувальних заходів на конкретні об'єкти довкілля молочної ферми. Результати визначення кількості бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* на об'єктах молочних ферм наведено в табл. 2.12.

Таблиця 2.12 – Кількість бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* на об'єктах молочних ферм ($M \pm m, n = 75$)

Об'єкт досліджень	Кількість бактерій <i>Cronobacter spp. (E. sakazakii)</i> в пробах		
	мінімальна	максимальна	середня
Змиви зі шкірних покривів тіла корів, тис. КУО/см ³	37 ± 15,3	87 ± 25,9	62 ± 29,3
Змиви з доїльних апаратів, КУО/см ³	27 ± 11,3	67 ± 23,9	42 ± 16,3
Змиви з молочного танка, КУО/см ³	17 ± 1,9	125 ± 25,3	16 ± 12,9
Змиви з підлоги корівника, тис. КУО/см ³	127 ± 24,6	667 ± 121,9	397 ± 55,3

Отже, як бачимо з наведеної табл. 2.12, рівень забруднення об'єктів молочних ферм бактеріями *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* досить значний і досягає $(667 \pm 121,9)$ КУО/см³. Цю найбільшу кількість бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* ми виділили зі змивів підлоги корівника. У змивах із шкірних покривів тварин кількість досліджуваних бактерій у середньому становила на (580 ± 96) КУО/см³ менше, ніж у змивах із підлоги. Мінімальна кількість бактерій *Enterobacter sakazakii*, що ми виявили, становила $(17 \pm 1,9)$ КУО/см³ у змивах із молочного танка.

Вивчення співвідношення бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* та мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* в сирому збірному молоці корів. Як свідчать попередні дослідження, бактерії *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* на досліджуваних об'єктах молочних ферм виявляли в значних кількостях. Для визначення місця цього мікроорганізму в популяції таких поширених у молоці корів, як мікроорганізми родини *Enterobacteriaceae*, ми розраховували співвідношення кількості бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* до загальної

кількості мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae*. Результати наведено в табл. 2.13.

Таблиця 2.13 – Співвідношення бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* до мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* в сирому збірному молоці корів ($M \pm m$, $n = 425$)

Гатунок молока	Середня кількість		Співвідношення
	Бактерій <i>Cronobacter spp. (E. sakazakii)</i> , КУО/см ³	Мікроорганізмів родини <i>Enterobacteriaceae</i> , тис. КУО/см ³	
«Екстра»	124 ± 21,4	17,91 ± 2,5	1:144–1:150
«Вищий»	875 ± 98,4	98,6 ± 12,0	1:112–1:120
«Перший»	1984 ± 153,1	200,7 ± 31,2	1:101–1:110
«Другий»	4753 ± 275,2	469,4 ± 52,0	1:98–1:110

Як бачимо з табл. 2.13, максимальне співвідношення між бактеріями *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* до мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* в сирому збірному молоці корів було в пробах молока гатунку екстра і становило 1:144–1:150, а мінімальне співвідношення між цими мікроорганізмами було в пробах молока другого гатунку – 1:98–1:110.

Установлення такого співвідношення сприяло отриманню показників, що можуть бути орієнтирами в прогнозуванні можливої наявності бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* в сирому збірному молоці корів.

Так, наприклад, при контамінації сирого збірного молока корів мікроорганізмами родини *Enterobacteriaceae* на рівні 100 тис. КУО/см³ можлива наявна кількість бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* буде становити в середньому від максимального значення 892 КУО/см³ до мінімального – 833 КУО/см³.

Наприкінці розділу можна зробити висновок про те, що бактерії *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* виділяються у 22,3 % випадків із сирого збірного молока корів. Найбільша частота виявлення цих мікроорганізмів була в пробах

молока першого та другого гатунків, а найменша – в пробах молока гатунку екстра. Кількість бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* в позитивних пробах була різною і в середньому становила від $(124 \pm 21,4)$ КУО/см³ у пробах молока гатунку екстра до $(4753 \pm 275,2)$ КУО/см³ – в пробах молока другого гатунку. Було встановлено, що проби маститного молока в 17,2 % випадків містять бактерії *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* із середньою кількістю $(6,3 \pm 1,2)$ тис. КУО/см³ і становлять потенційну небезпеку потрапляння цих мікроорганізмів в сире збірне молоко корів під час його виробництва. Під час дослідження об'єктів довкілля молочної ферми було встановлено, що найчастіше і у великих кількостях бактерії *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* були виявлені в змивах із підлоги корівника та змивах зі шкірних покривів тіла тварин.

Максимальне співвідношення між бактеріями *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* до мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* в сирому збірному молоці корів було в пробах молока гатунку екстра і становило 1:144–1:150, а мінімальне співвідношення між цими мікроорганізмами було в пробах молока другого гатунку – 1:98–1:110.

РОЗДІЛ 3

ХАРАКТЕРИСТИКА НЕБЕЗПЕКИ

Для характеристики небезпеки аналізують тяжкість і тривалість несприятливих реакцій із боку організму людини внаслідок дії мікроорганізму та його токсину, включаючи клінічні форми захворювання, патофізіологічні й епідеміологічні характеристики (спорадичний або епідемічний рівень захворюваності) процесу, ймовірність вторинного поширення та зміни якості життя.

Для якісної оцінки мікробіологічного ризику важливу роль відіграє оцінка біологічних характеристик патогену (фенотипічні й генетичні характеристики); механізми вірулентності та патогенності патогену; механізми інфікування і вхідні ворота інфекції; ймовірність вторинного поширення; варіабельність штаму; резистентність до антибіотиків та її вплив на тяжкість захворювання; наслідки інфікування; рівні захворюваності, поширеності, смертності.

Поширення та характеристика захворювань, спричинених Cronobacter spp. (Enterobacter sakazakii). За останні 20–25 років у високо-розвинених країнах світу, зокрема Великобританії, Бельгії, Франції, Німеччині, США та інших, усе частіше реєструються випадки летальності (від 30–50 % в окремих випадках близько 80 %) серед новонароджених дітей з ознаками менінгіту [208, 226, 256, 361, 339, 395, 398, 401, 408, 465, 475], сепсису [199, 226, 256, 257, 259, 361, 395] та некротичного ентероколіту [256, 259, 260, 298, 361, 449, 467], які пов'язують із уживанням сухих молочних сумішей для дитячого харчування, що містили патогенний збудник із родини *Enterobacteriaceae* – *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* [188, 199, 250, 255, 267, 297, 301, 302, 313, 400–403]. У таблиці 3.1 наведено зареєстровані випадки захворюваності та летальності, пов'язані з *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* у світі.

Таблиця 3.1 – Зареєстровані випадки захворюваності та летальності від *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* у світі

Країна	Рік	Кількість зареєстрованих випадків (з яких летальних)	Симптом	Причина
Великобританія [455]	1958	2 (2)	Менінгіт	Невстановлена
Німеччина [310]	1958	1 (1)	Менінгіт	Невстановлена
Грузія [381]	1958	1 (0)	Бактеріємія	Невстановлена
США (штат Індіана) [331]	1981	1 (0)	Менінгоенцефаліт	Невстановлена
Німеччина [387]	1983	8 (6)	Менінгіт і сепсис	Дитячі сухі суміші
Греція [190]	1984	11 (4)	Респіраторний синдром, сепсис, менінгіт	Невстановлена
США (штат Міссурі) [391]	1985	1 (0)	Менінгіт	Дитячі сухі суміші
США (штат Масачусет) [465]	1985	2 (1)	Менінгіт	Невстановлена
Ісландія [202]	1986 1987	3 (1)	Менінгіт, септицемія	Дитячі сухі суміші
Туніс [439]	1988	4 (0)	Сепсис, діарея	Дитячі сухі суміші
США [439]	1989	4 (0)	Сепсис, діарея	Дитячі сухі суміші
США [220]	1990	2 (0)	Менінгіт, бактеріємія,	Дитячі сухі суміші
Франція [196]	1994	13 (3)	Менінгіт	Дитячі сухі суміші
США [263, 400]	1988	2 (невідомо)	Менінгіт	Дитячі сухі суміші
	1990	1 (0)	Бактеріємія	Дитячі сухі суміші
	1991	1 (0)	Менінгіт	Дитячі сухі суміші
	1997	1 (0)	Менінгіт	Невстановлена
Бельгія [457]	1998	12 (2)	Некротичні ентероколіти	Дитячі сухі суміші
Ізраїль [194, 203]	1999 2000	2 (0)	Бактеріємія, менінгіт	Дитячі сухі суміші
США	2000	1 (0)	Бактеріємія, мозкові абсцеси	Невідомо
Туніс [290]	2001	10 (1)	Менінгіт, ентероколіт	Дитячі сухі суміші
Бельгія [284]	2001	12 (невідомо)	Менінгіт, ентероколіти	Дитячі сухі суміші
	2002	1 (1)	Менінгіт	Дитячі сухі суміші
Індія [423]	2002	2 (0)	Менінгіт, бактеріємія	Дитячі сухі суміші
Нова Зеландія [423]	2004	5 (1)	Менінгіт	Дитячі сухі суміші
Франція [423]	2004	4 (2)	Ентероколіти	Дитячі сухі суміші

Як бачимо з таблиці 3.1, перші поодинокі випадки захворювання/летальності були виявлені ще в 60-х роках ХХ ст. в країнах Європи, в 70-х роках ХХ ст. це захворювання було зареєстроване в США. У подальшому такі випадки стали виявлятися все частіше і в інших країнах світу, що можна пояснити проведенням більшої кількості досліджень та їх удосконаленням. Вищезазначене свідчить про існування реальної загрози здоров'ю дітей від *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* в дитячих сухих сумішах.

Найбільшою групою ризику є новонароджені з низькою масою тіла або недоношені, малюки до 28 діб після народження, малюки, народжені від ВІЛ-інфікованих матерів, та малюки з імунodefіцитом. Смертність серед малюків становить від 40 до 80 % [199, 208–210, 467].

Незважаючи на те, що найчастіше інфекція, викликана бактеріями *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*, виникає у малюків до 1 року з ознаками менінгіту, сепсису, некротичного ентероколіту, є відомості про випадки реєстрування цієї інфекції у дорослих, в яких інфекція проходить, як правило, з ознаками сепсису і жодного випадку менінгіту у дорослих не зареєстровано [244, 260, 286, 402].

Мало наукових повідомлень стосовно дози або кількості бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*, здатної спричиняти захворювання. Використовуючи новонароджених мишенят-сисунів, F. Pagotto та ін. (2003) визначили мінімальні летальні дози для 18 ізолятів бактерій *E. sakazakii* (9 ізолятів із клінічного матеріалу, 8 ізолятів із харчових продуктів та один штамп). Ізоляти вводили як орально, так і внутрішньочеревно. При цьому всі ізоляти, які вводили внутрішньочеревно, були летальними дозою 1×10^8 КУО, для 2 ізолятів мінімальною летальною дозою була кількість мікроорганізмів 1×10^5 КУО. Два з 18 ізолятів були летальними при оральному введенні [421].

Систематика і номенклатура. *Cronobacter spp. (Enterobacter sakazakii)* належить до родини *Enterobacteriaceae* – це група колиформних мікроорганізмів, які використовуються в мікробіології харчових продуктів як санітарно-показові мікроорганізми (індикатори фекального забруднення).

Родина *Enterobacteriaceae* налічує близько 50 родів мікроорганізмів, серед яких більшість відомі як патогенні, що можуть спричинити виникнення токсикоінфекцій у людей. Найпоширенішими мікроорганізмами серед цієї родини є мікроорганізми родів *Escherichia* (*E. coli*, ентеропатогенна *E. coli* O₇ H₁₅₇), *Proteus* (*P. vulgaris*, *P. mirabilis*), *Salmonella* (*S. cholerae-suis*, *S. enteritidis*), *Cronobacter* (*C. sakazakii*), *Klebsiella* (*Kl. aerogenes*, *Kl. pneumoniae*), *Yersinia* (*Y. enterocolitica*), *Serratia*, *Morganella*, *Shigella* та інші, які потрапляють у харчові продукти із доквілля [159, 261, 319, 324, 242, 277].

Ентеробактерії – це грам-негативні, аеробні або факультативно анаеробні, рухливі і нерухливі мікроорганізми 1,2–3 мкм довжиною та 0,6–1 мкм шириною. Основною ознакою цієї групи мікроорганізмів є розщеплення глюкози та інших вуглеводів з утворенням кислоти [116, 159, 319, 322]. Нижче на рис. 3.1 наведена класифікація представників цієї родини.

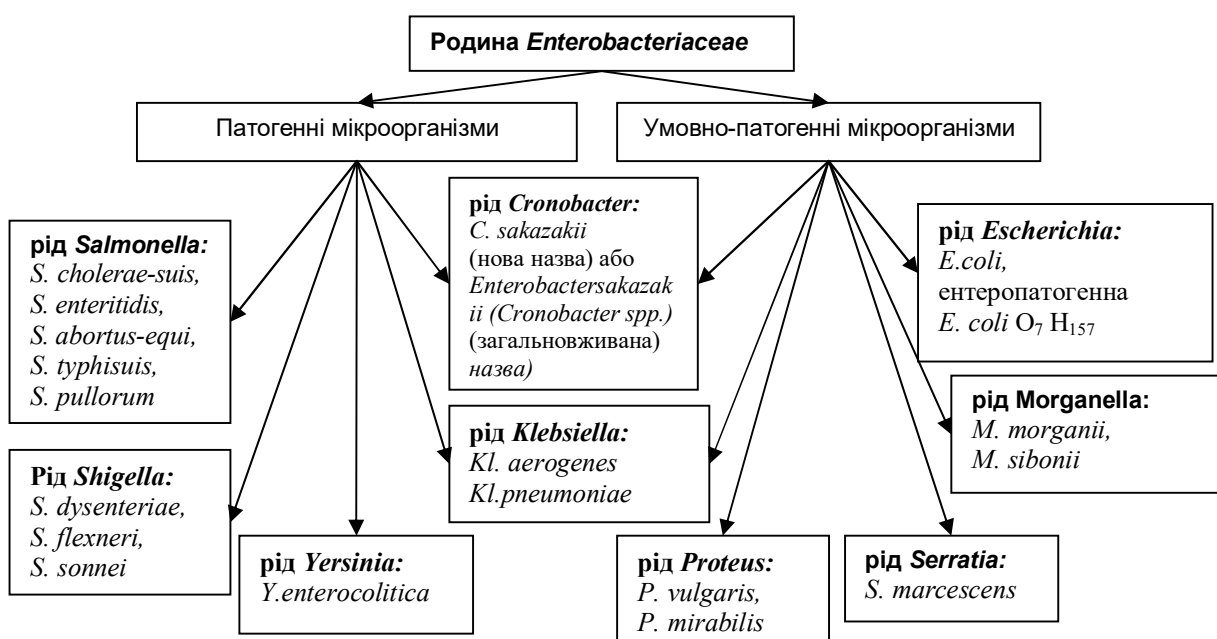


Рисунок 3.1 – Класифікація представників родини *Enterobacteriaceae*

Уперше збудника було виділено в 1958 році з патологічного матеріалу в Англії, про що описано в працях А. М. Urmenyi, I. W. Franklin (1961) [465]. До 1980 року *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* був відомий як *Enterobacter cloacae*, що продукує жовтий пігмент, але після детального вивчення його властивостей цей мікроорганізм було віднесено до окремого виду і названо на честь японського дослідника Riichi Sakazaki. Тобто, починаючи з 1980 року, вид *E. sakazakii* належав до роду *Enterobacter* родини *Enterobacteriaceae* [259, 307, 310, 312] (рис. 3.2).

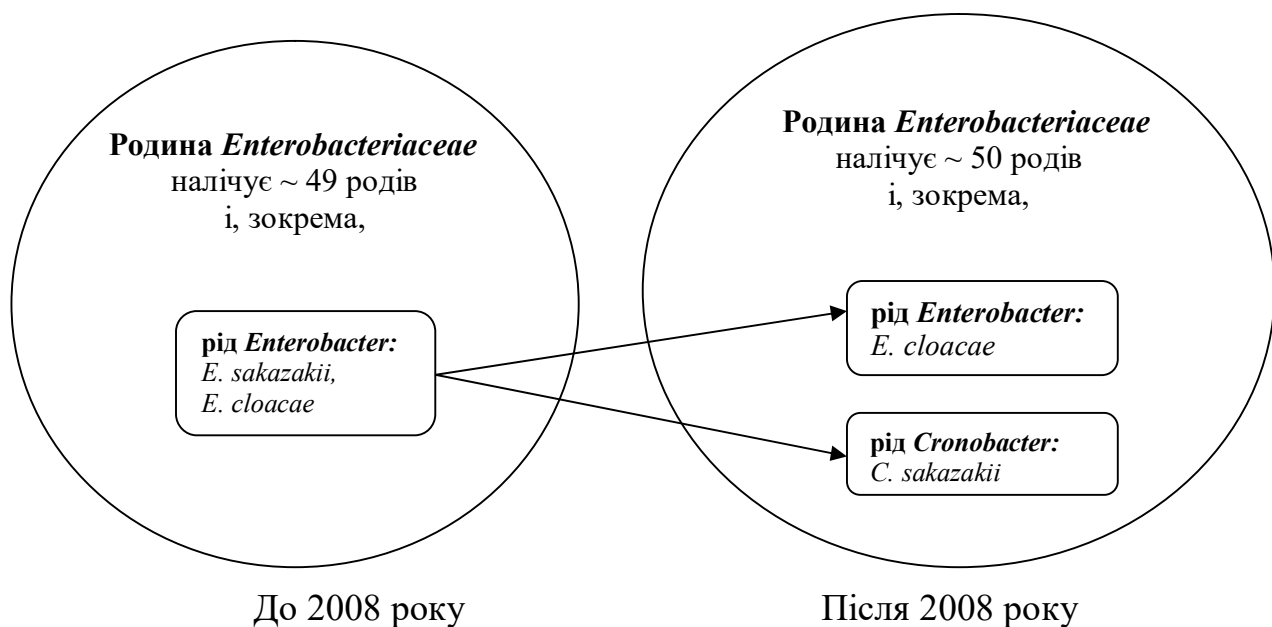


Рисунок 3.2 – Рекласифікація *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*, запропонована С. Iversen (2008)

Із часом багато різних біогруп або підвидів бактерій було типовано як *Enterobacter sakazakii*. У 2007 році дослідною групою під керівництвом Carol Iversen (Centrefor Food Safety, School of Agriculture, Food Science and Veterinary Medicine, University College Dublin, Ireland) із використанням сучасних генетичних досліджень було встановлено та доведено взаємозв'язок між цими різними біогрупами та підвидами *Enterobacter sakazakii*. Ця робота наштовхнула науковців на думку про рекласифікацію та відокремлення цього мікроорганізму і його підвидів як окремий рід *Cronobacter* [307]. Нова рекласифікація мікроорганізму наведена на сторінках International Journal of

Systematic and Evolutionary Biology (2008) та ін. і погоджена на 31-й сесії Комісії Кодекс Аліментаріус у 2008 році, але найчастіше поряд із новою назвою користуються й старою (рис. 3.2) [307].

Отже, з 2008 року *Enterobacter sakazakii* рекласифікований як *Cronobacter spp.*, що налічує шість окремих видів та 16 біогруп, об'єднаних в один рід *Cronobacter*, який належить до родини *Enterobacteriaceae* і представлені: *C. sakazakii*, *C. turicensis*, *C. malonaticus*, *C. muytjensii*, *C. dublinensis* та *C. genomospecies 1* (табл. 3.2) [307, 308, 310, 312].

Таблиця 3.2 – Представники роду *Cronobacter spp.* згідно з С. Iversen та ін. (2008 р.) [307]

Рід	<i>Cronobacter</i>	
Види	<i>Cronobacter sakazakii</i> , <i>Cronobacter malonaticus</i> , <i>Cronobacter muytjensii</i> , <i>Cronobacter turicensis</i> , <i>Cronobacter dublinensis</i> , <i>Cronobacter genomospecies 1</i>	біогрупи 1–4, 7, 8, 11,13; біогрупи 5, 9, 14; біогрупа 15; біогрупа 16; біогрупи 6, 10, 12
Підвиди	<i>Cronobacter dublinensis subsp. dublinensis</i> , <i>Cronobacter dublinensis subsp. lactaridi</i> , <i>Cronobacter dublinensis subsp. lausannensis</i>	

Джерела виділення різних видів бактерій роду *Cronobacter spp.* наведені в таблиці 3.3 [307, 308, 360].

Таблиця 3.3 – Джерела виділення бактерій роду *Cronobacter spp.*

Бактерія роду <i>Cronobacter</i>	Джерела виділення
<i>Cronobacter sakazakii</i>	Клінічний матеріал, об'єкти довкілля, продукти харчування
<i>Cronobacter turicensis</i>	
<i>Cronobacter malonaticus</i>	
<i>Cronobacter mytjensii</i>	
<i>Cronobacter dublinensis</i>	
<i>Cronobacter genomospecies 1</i>	Об'єкти довкілля, продукти харчування

Примітка. Клінічний матеріал: кров, фекалії, спінальна рідина; об'єкти довкілля: обладнання заводів, вода; продукти харчування: сухі продукти, сухе молоко, сухі дитячі суміші

Назва роду *Cronobacter* походить із грецької міфології. Згідно з легендою існував Бог Кронос (Cronos), який був сином Урана (Uranus) та Геї (Gaia). Він був наймолодшим із 12 титанів. Але згодом Кронос став царем над усіма титанами і взяв в дружини свою сестру Рею (Rhea), яка народила йому кілька дітей. Проте Кронос був попереджений своїми батьками, що він буде вбитий власною дитиною. Тому він проковтнув усіх своїх дітей. Тоді Рея обдурила його: народила ще одну дитину, яку згодом назвали Зевсом (Zeus), і заховала її на Криті. Коли Зевс виріс, він почав війну зі своїм батьком та переміг його. Оскільки мікроорганізм *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* пов'язаний із високою смертністю малюків, то була запропонована назва *Cronobacter* саме на честь Бога Кроноса [307].

Систематика бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* наведена в таблиці 3.4.

Таблиця 3.4 – Систематика (таксономія) *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*

Царство	<i>Bacteria</i>
Підцарство	<i>Proteobacteria</i>
Відділ	<i>Gamma</i> <i>proteobacteria</i>
Клас	<i>Enterobacteriales</i>
Родина	<i>Enterobacteriaceae</i>
Рід	<i>Cronobacter</i>
Вид	<i>Cronobacter spp. (Enterobacter sakazakii)</i>
Синоніми	<i>Enterobacter sakazakii (E.sakazakii)</i>
	<i>Cronobacter sakazakii</i>
	<i>yellow-pigmented Enterobacter cloacae</i>
	<i>Cronobacter sakazakii subsp. sakazakii</i>
	<i>Cronobacter spp.</i>

Біологічні характеристики збудника. *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* – це грам-негативна, рухлива паличка (перитрих), що належить до родини *Enterobacteriaceae* роду *Cronobacter*. Типові види спор та капсул не утворюють, проте трапляються капсульні штами. Бактерія має розміри до 3 мкм довжиною та до 1 мкм шириною [116, 259–261, 307].

Бактерії *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* є факультативними анаеробами, температурні межі росту яких досягають від мінімальних 5–8 °С до максимальних – 41–45 °С, а оптимальною температурою є 37–44 °С [116, 309, 363, 402]. У деяких випадках ріст бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* на густих та рідких живильних середовищах був відзначений за температури 47 °С, а за температури 4 °С ріст мікроорганізму повністю припинявся [212, 259, 326]. Є інші відомості щодо низьких температур, за яких спостерігався ріст бактерій *E. sakazakii*: 5,7 °С [305], 5,5 °С [401], 3,6 °С [326] та 3,4 °С [212]. Як бачимо з вищезазначеного, бактерія *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* є термофільним мікроорганізмом із родини *Enterobacteriaceae* [20, 23, 218, 401].

Проте існують дані S. G. Edelson-Mammel і R. L. Buchanan (2004), P. Breeuwer (2003), які доводять, що мікроорганізм не є вже таким терmostійким й існують штами, які є стійкими або нестійкими до високих температур [218, 212]. Наукові праці A. Lehner та R. Stephan (2004) засвідчують, що бактерії *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* здатні рости за температур холодильника [361]. За даними С. Iversen та ін. (2004), мікроорганізм був життєздатним у відновлених сухих сумішах для дитячого харчування, які зберігалися за температури 6 °C [305].

Бактерії *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* ростуть на більшості живильних середовищ для ентеробактерій (середовище Мак-Конкі, середовище Ендо) з оптимальними межами рН середовища від 5 до 9. За наявності в живильних середовищах глюкози чи цитратів (солей лимонної кислоти) незалежно від умов культивування (аеробних чи анаеробних) бактерії *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* не потребують вітамінів, амінокислот чи інших органічних стимуляторів росту [116, 277, 281].

Н. L. Muytjens та ін. (1984) вперше виявив α -глюкозидазну активність 129 ізолятів (100 %) бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*. Цієї властивості не було виявлено в 97 інших видах *Enterobacter*, зокрема *E. cloacae* та *E. aerogenes* (інша назва – *Pantoea agglomerans*) [396]. J. J. Farmer та ін. (1985, 1999) підтвердили це, виявивши у 53 із 57 штамів *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* позитивну реакцію на α -глюкозидазу [260, 262].

Цю властивість мікроорганізму почали враховувати, і для полегшення його виділення розроблені живильні середовища, які містять селективний маркер для виявлення ферменту α -глюкозидази, що виділяється бактеріями *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* і чітко відрізняє їх від інших бактерій: Druggan-Forsythe-Iversen агар (DFI Agar) [304], середовище Oh-Kang (OK Agar) [413] та Leuscher-Baird-Donald-Cox агар [366].

Основною диференціальною ознакою для бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* є продукування жовтого пігменту, тобто утворення на живильному середовищі колоній жовтого кольору. Для цього використовують

триптон-соєвий агар, на якому проводять тривале культивування культур упродовж (48 ± 2) годин (інколи – до 72 годин) за температури 25 °С [11, 94, 111, 252–254, 300]. Лише за цих умов можливе утворення колоній із жовтим пігментом бактеріями *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*. Але є відомості про існування інших видів бактерій із родини *Enterobacteriaceae*, що можуть виділятися з клінічного матеріалу та води й утворювати жовтий пігмент на триптон-соєвому агарі [413, 414].

Проте *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* також можуть утворювати жовті колонії й на звичайному живильному агарі, до того ж жовті колонії на цьому самому середовищі утворює інший споріднений вид ентеробактерій – *E. agglomerans*, що теж часто виділяється із сухих сумішей для дитячого харчування. Тому виникають певні труднощі з ідентифікацією та диференціацією цих двох споріднених бактерій [54, 306, 308, 397]. Для повної ідентифікації *E. sakazakii* та *E. agglomerans* необхідно проводити детальне вивчення культурально-біохімічних властивостей цих видів мікроорганізмів [54, 55, 94, 95, 252–254, 300].

Ураховуючи те, що бактерії *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* порівняно з іншими видами з родини *Enterobacteriaceae* і насамперед *E. cloacae* та *E. agglomerans* мають подібні морфологічні (грам-негативні тонкі палички розміром 0,3–1,0 x 0,6–1,0 мкм, рухливі, спор не утворюють) та культуральні властивості (ростуть за наявності кисню та без нього на середовищах для ентеробактерій, не потребують як стимуляторів росту вітамінів та амінокислот), їх видова ідентифікація та диференціація повинні бути підтверджені біохімічними властивостями [54, 55, 94, 95, 252–254, 300, 306, 308]. Тому російськими науковцями Н. Р. Єфімочкіною, С. А. Шевелевою та ін. (2009) розроблено розширену біохімічну ідентифікацію всіх типів ізолятів ентеробактерій, виділених із сухих молочних сумішей та продуктів для дітей, щодо встановлення виду *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*. На думку вчених, виділені ентеробактерії, що утворюють жовтий пігмент, не ферментують сорбіт

та не розріджують желатину, можуть бути віднесені до виду *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) [54].

Отже, встановлено дві основні біохімічні відмінності між *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) та іншими видами ентеробактерій. По-перше, це глюкозидазна активність (утворення кислоти з α -метил-D-глюкозиду), інша ж відмінність – це негативна реакція на D-сорбітол [54, 55, 94, 95, 252–254, 300, 306, 308].

Для встановлення біохімічної ідентифікації ентеробактерій та інших грам-позитивних паличкоподібних мікроорганізмів розроблено тест-системи API 20E (результати – через 18–24 годин) та Rapid 20E (результати – через 4 години) «BioMerieux» (Франція), що складаються з прозорої полімерної пластинки з 20 мікропробірками об'ємом 0,25 см³, які містять сухі субстрати для визначення 20 показників, зокрема, аргініндигідролази, лізиндекарбоксілази, орнітиндекарбоксілази, уреаз, желатинази; утворення індолу, сірководню, ацетоїну; ферментації цитрату, глюкози, манітолу, сорбітолу, амідалину, рамнози, сахарози та ін. Для дослідження використовують ізольовані колонії, отримані на щільному живильному середовищі. Зведені дані щодо основних біологічних характеристик бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) наведено в таблицях 3.5 та 3.6.

Таблиця 3.5 – Біологічні характеристики різних видів ентеробактерій

Тест	<i>E. sakazakii</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>E. agglomerans</i>	<i>E. aerogenes</i>
1	2	3	4	5
Фарбування за Грамом	–	–	–	–
Рухливість	+	+	(+)	+
Оксидаза	–	–	–	–
Каталаза	+	+	+	+
Утворення індолу	(–)	–	(–)	–
Реакція з метиловим червоним	–	–	–	–

Продовження таблиці 3.5

1	2	3	4	5
Реакція Фогеса – Проскауера	+	+	(+)	+
Утилізація цитратів	+	+	+	+
Утворення H ₂ S	–	–	–	–
Гідроліз сечовини	–	н	–	–
Лізиндекарбоксилаза	–	–	–	+
Аргініндегідролаза	+	+	–	–
Орнітиндекарбоксилаза	+	+	(–)	+
Розрідження желатину за температури 22 °С	–	–	–	–
Жовтий пігмент за температури 24 °С	+	–	(+)	–
Ріст за наявності KCN	+	+	–	+
Утворення кислоти з D- глюкози	+	+	+	+
Утворення газу з D- глюкози	+	+	+	+
Утворення кислоти з:				
Лактози	+	+	(+)	+
Сахарози	+	+	(+)	+
Дульцитолу	–	(–)	(–)	–
D-адонітолу	–	(–)	–	+
L-арабінози	+	+	+	+
Гліцеролу	(–)	н	н	+
D-ксилози	+	+	+	+
Рафінози	+	(+)	(+)	+
D-сорбітолу	–	+	(+)	+
α-Метил-D-глюкозиду	+	(+)	–	–
Мальтози	+	+	+	+
D-манітолу	+	+	+	+
D-манози	+	+	+	+

Продовження таблиці 3.5

1	2	3	4	5
Мелібіози	+	+	+	+
L-рамнози	+	+	+	+
Саліцину	+	(+)	+	+
Трегалози	+	+	+	+
Відновлення нітрату	+	+	+	+
Дезоксирибонуклеаза за температури 25 °С	–	–	–	–
Ліпаза	–	–	–	–
Мукоїдний ріст	+	+	+	+

Примітка: «+» – 90–100 % штамів позитивні; «(+)» – 21 – 89 % штамів позитивні; «←» – 0–9 % штамів позитивні; «(–)» – 10–24 % штамів позитивні; н – невідомо

Таблиця 3.6 – Основні характеристики бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*)

Загальні дані	<ul style="list-style-type: none"> • Бактерія з родини <i>Enterobacteriaceae</i>, рід <i>Cronobacter</i>. • Належить до емерджентних патогенів. • До 1980 року <i>Enterobacter cloacae</i>, що утворює жовтий пігмент. • Із 1980 року названий на честь японського вченого-бактеріолога Riichi Sakazaki. • Із 2007 року рекласифікований, як <i>Cronobacter sakazakii</i> або <i>Enterobacter sakazakii</i> (<i>Cronobacter spp.</i>)
Морфологія	<ul style="list-style-type: none"> • Грам-негативна паличка. • Рухлива (перитрих). • Спор не утворює. • Деякі види утворюють капсули. • Розміри 3x1 мкм. • Утворює біоплівки
Культуральні властивості	<ul style="list-style-type: none"> • Факультативний анаероб. • Температурні межі росту 5–47 °С: мінімальні 5–8 °С; максимальні 45–47 °С; оптимальні 37–44 °С. • Утворює жовті колонії на триптон-соевому агарі

Продовження таблиці 3.6

Біохімічні властивості	<ul style="list-style-type: none"> • Оксидазонегативний. • Каталазопозитивний. • Лактозопозитивний. • Сорбітолонегативний. • Глюкозидазопозитивний
Джерела виділення	<ul style="list-style-type: none"> • Харчові продукти (молоко та молочні продукти (сухі дитячі суміші, сир, сухе молоко), м'ясо та м'ясні продукти, овочі, фрукти, спеції). • Вода. • Об'єкти переробних заводів, лікарень та помешкань людей. • Ґрунт
Вірулентний фактор	<ul style="list-style-type: none"> • Ентеротоксин
Група ризику	<ul style="list-style-type: none"> • Немовлята до 6 міс. • Недоношені малюки (маса тіла до 1 800 г). • Діти з імунодефіцитом
Клінічні ознаки захворювання спричиненого <i>E. sakazakii</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Септицемія. • Менінгіт. • Некротичний ентероколіт. • Смертність 10–50 % (до 80 %)

Отже, як бачимо з вищенаведеного огляду літератури, бактерії *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) є представниками родини *Enterobacteriaceae*. Поряд з основними характеристиками, властивими для цієї родини, бактерії *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) мають специфічні біологічні властивості, а саме: утворюють жовтий пігмент на триптон-соєвому агарі, глюкозидазопозитивну активність, не ферментують сорбіт і не розріджують желатин.

Стійкість до факторів зовнішнього середовища різних штамів бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) є важливим під час оцінки мікробіологічного ризику, а саме характеристики небезпеки.

Механізм стійкості бактерії *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) до дії факторів зовнішнього середовища маловивчений, проте відомо, що мікроорганізм має декілька відмінних характеристик та фізіологічних бар'єрів,

які допомагають їй пережити стреси (висушування, дія високих температур, зміни осмотичного тиску, наявність антибіотиків). Це формування біоплівки (biofilmformation) – скупчень бактеріальних клітин, продукування екстрацелюлярних (позаклітинних, зовнішньоклітинних) полісахаридів (утворення капсули), прилипання до гідрофільних та гідрофобних поверхонь, створення міжклітинних «сигналів» з іншими мікроорганізмами [305, 333, 362].

Так, Н. Kim та ін. (2006) довели, що бактерії *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) здатні формувати скупчення бактеріальних клітин на поверхні силікону, латексу, скла, полівінілхлориду, нержавіючої сталі [333]. Також відомо, що деякі штами бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) здатні утворювати капсулу, яка є однією з біологічно важливих структур для захисту мікроорганізму від дії факторів зовнішнього середовища, і насамперед від висушування та фагоцитозу [305]. Основа капсули мікроорганізму – це екстрацелюлярний полісахарид, що складається з галактози, фруктози, глюкози, глюкуронової кислоти та ацетатів (солі оцтової кислоти). Крім полісахариду, до складу капсули входять білки та ліпіди. С. Iversen та ін. (2004) стверджують, що капсульовані штами бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) мають кращу здатність до формування скупчень бактеріальних клітин та прилипання до поверхонь субстрату. І на додаток утворені скупчення з бактеріальних клітин, що мають капсули, є більш щільними на відміну від тих скупчень клітин, які не мають капсул. Штами бактерій, що утворюють капсули, є важливими, оскільки вони колонізують об'єкти молочних заводів [305].

Також із наукових праць Р. Вреєуверта ін. (2003) відомо, що продукування екстрацелюлярних полісахаридів та утворення капсули бактеріями *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) сприяють їх кращому витримуванию низьких значень активності води [212].

Як було вищезазначено, *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) є термофільним мікроорганізмом із родини *Enterobacteriaceae* [402]. Проте існують дані, які свідчать про те, що мікроорганізм не є вже таким терmostійким, але може адаптовуватися до висушування та змін осмотичного тиску [212]. Так,

М. Nazarowec-White та ін. (1999), L. Iversen та ін. (2004) доводять, що стандартні параметри пастеризації діють згубно на бактерії *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*. За даними S. G. Edelson-Mammel та R. L. Buchanan (2004), для відновлення сухих сумішей для дитячого харчування досить застосування води, підігрітої до 70 °С. Ризик від бактерії *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* буде знижено [246]. Ці дані дають можливість стверджувати про наявність штамів бактерії *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*, різних до дії високих температур.

Для визначення термотолерантності (стійкості щодо високих температур) будь-яких мікроорганізмів користуються показником D-value (від англ. value – величина, тривалість) або decimal reduction time (у перекладі англ. – час десятичного зниження). Отже, D-value означає час (у хвиликах) дії певної температури, що необхідний для зменшення кількості мікроорганізмів на 90 % ($1 \log_{10}$) (або час, за який гине 90 % мікроорганізмів за певної температури).

Так, загибель 90 % бактерій різних штамів *E. sakazakii* за температури 58 °С відзначали впродовж 2,4–4,2 хвилини, отже, $D_{58^{\circ}\text{C}} = 2,4\text{--}4,2$ хв, що порівняно з іншими видами ентеробактерій є більш термостійким [400]. Подібні дані були одержані S. G. Edelson-Mammel та R. L. Buchanan (2004), які доводять, що D-value для досліджуваних ними штамів бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* за температури 58 °С становив від 30,5 секунди до 9,9 хвилини ($D_{58^{\circ}\text{C}} = 30,5\text{--}9,9$ хв), а за t 72 °С – 1,3 секунди, що дало можливість установити наявність штамів більш та менш стійких до дії високих температур [246]. С. Iversen та ін. (2004) встановили D-value для 71 °С, що дорівнював 0,7 секунди [305].

У таблиці 3.7 наведено термотолерантність різних штамів бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* порівняно з іншими представниками родини *Enterobacteriaceae* (ФАО 2004).

Таблиця 3.7 – Порівняння термотолерантності різних штамів бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) та інших представників родини *Enterobacteriaceae*

Штам мікроорганізму	D _{58°C} (час)	Літературне джерело
<i>E. sakazakii</i> 607	Від 30,5 секунди до 9,9 хвилини	218, 246
<i>E. sakazakii</i> (N&F-pooled)	2,4–4,2 хвилини	400
<i>E. sakazakii</i> 51329	60 секунд	218
<i>E. coli</i> O157:H7	440 секунд	
<i>E. coli</i>	198 секунд	
<i>K. pneumoniae</i>	320 секунд	
<i>Salmonella</i>	225 секунд	
<i>E. aerogenes</i>	80 секунд	

За даними С. Iversen та ін. (2004), важливим у вивченні термотолерантності бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) є наявність або відсутність у них капсул [305]. Нижче в таблиці 3.8 наведені зведені дані різних авторів стосовно показників D-value та Z-value для штамів бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*), що мають та не мають капсули і штамів, які були виділені з патологічного матеріалу й харчових продуктів (ФАО, 2004).

Таблиця 3.8 – Зведені дані показників D-value та Z-value для різних штамів бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*

D-value (хвилини)									Z-value (°C)	Штами бактерій <i>Cronobacter spp. (E. sakazakii)</i> , що були використані в досліді	Літературні джерела
52 °C	53 °C	54 °C	56 °C	58 °C	60 °C	62 °C	65 °C	70 °C			
54,8 ± 4,7		23,7 ± 2,5	10,3 ± 0,7	4,2 ± 0,6	2,5 ± 2				5,8	П'ять штамів із патологічного матеріалу та п'ять штамів із продуктів	400–403
	8,3–20,2	6,4–7,1	1,1 – 2,4	0,27–0,5					3,1–3,6	Штами на фосфатному буфері	212
			21,1 ± 2,7	9,9 ± 0,8	4,4 ± 0,4		0,6 ± 0,3	0,07	5,6	Термостійкі штами	246
		16,4 ± 0,67	5,1 ± 0,27	2,6 ± 0,48	1,1 ± 0,11	0,3 ± 0,12			5,8 ± 0,40	Штами бактерій, що не мали капсул	305
		11,7 ± 5,80	3,9 ± 0,06	3,8 ± 1,95	1,8 ± 0,82	0,2 ± 0,11			5,7 ± 0,12	Штами бактерій, що мали капсули	

Висушені та бактерії *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*, що перебувають у стаціонарній фазі розвитку, можуть виживати за підвищеної температури 45 °C і рости за температури 47 °C [212].

За даними М-К. Jung та J-Н. Park (2006), під час вивчення штамів *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*, виділених із різних продуктів, показало, що вони гинули за температури 60 °C упродовж різних проміжків часу: від 3,52 до 3,58 хвилини (із сухих молочних сумішей для дитячого харчування), від 3,79 до 3,86

хвилини (із коричневого рису) та від 4,40 до 4,79 хвилини (з іншої сільськогосподарської продукції) [321].

J. B. Gurtler та L. R. Beuchat (2007) доводять, що *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) виживають у сухих сумішах для дитячого харчування за низької активності води (a_w від 0,25 до 0,86) та низьких температур (4–30 °C) [278].

За даними M. Nazarowec-White та J. M. Farber (1997), під час порівняльного вивчення термальної резистентності 5 штамів бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*), виділених із клінічного матеріалу від хворих із різних лікарень Канади, та 5 штамів бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*), виділених із сухих продуктів для дитячого харчування, які продаються в супермаркетах Канади, було встановлено, що D-value перших були вищими, ніж у решти [400, 401] (табл. 3.9).

Таблиця 3.9 – Порівняння D-value (у хвилинах) 5 штамів бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*), виділених із клінічного матеріалу та 5 штамів бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*), виділених із сухих продуктів для дитячого харчування [400, 401]

Штам	Температура, °C				
	52	54	56	58	60
Із клінічного матеріалу	54,76 ± 5,69	36,72 ± 6,07	10,91 ± 1,52	5,45 ± 0,46	3,06 ± 0,12
Із сухих продуктів для дитячого харчування	54,82 ± 7,21	18,57 ± 1,14	7,75 ± 0,47	3,44 ± 0,35	2,15 ± 0,07

Було встановлено, що бактерії *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) мають природну стійкість до всіх макролідів, лінкоміцину, кліндаміцину,

стрептограміну, рифампіцину, фосфоміцину, проте чутливі до аміноглікозидів, тетрацикліну, хлорамфеніколу [455].

Встановлено, що найбільш дієвими під час лікування інфекцій, спричинених *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*, є ампіцилін з гентаміцином або ампіцилін із хлорамфеніколом та цефотаксим і цефуроксим. Під час вивчення антибіотикочутливості виділених ізолятів *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* з різних клінічних матеріалів (мокроти, шкіри, фекалій, перитонеальної рідини, слизової оболонки ока) при спалаху захворювання 13 малюків у Франції у 1994 році були встановлені їх чутливість до ципрофлоксацину, амікацину, гентаміцину, піперацину та триметоприму і стійкість до доксицикліну [347].

За даними науковців із University College Dublin, 33 ізоляти *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*, які вони тестували, були чутливими до канаміцину, гентаміцину, тетрацикліну, ампіциліну, хлорамфеніколу, ципрофлоксацину та налідиксової кислоти, але 17 ізолятів із 33 (51 %) були стійкими до цефалотину. А 16 ізолятів *Cronobacter*, виділених із різних видів продуктів Єгипту (сухе молоко, сир, сухі суміші для дитячого харчування), теж були тестовані щодо чутливості до антибіотиків. Було встановлено їх чутливість до стрептоміцину, ампіциліну, спектиноміцину, гентаміцину та фуразолідону.

Результати вивчення основних характеристик та властивостей виділених штамів бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*. Серед виділених нами із сирого молока та об'єктів молочних ферм із різних господарств України штамів бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* 25 (5 штамів – із сирого збірного молока корів, 5 штамів – із секрету вим'я корів, хворих на субклінічний мастит, 6 штамів – зі змивів із доїльних апаратів, 3 штами – із змивів молочних танків, 6 штамів – із змивів з підлоги корівника) були детально вивчені за морфологічними, культуральними та біохімічними властивостями.

Мікроскопічні дослідження виділених штамів бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* засвідчили, що мікроорганізми були представлені грам-негативними короткими із заокругленими кінцями паличками, які не мали спор

та капсул (рис. 3.3). У мазках вони були розміщені поодинокі чи густими скупченнями.

Під час вивчення штамів бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) на ультраструктурному рівні з використанням растрового електронного мікроскопа було встановлено їх розміри: довжина – від 1 до 3 мкм та ширина – від 0,4 до 1 мкм (рис. 3.4, 3.5).

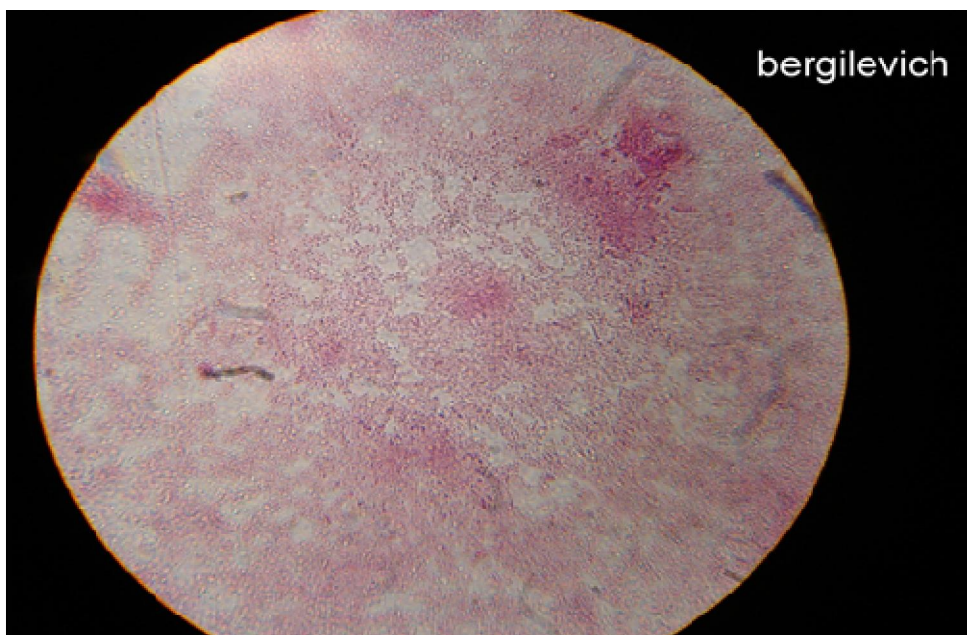


Рисунок 3.3 – Клітини *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) під світловим мікроскопом

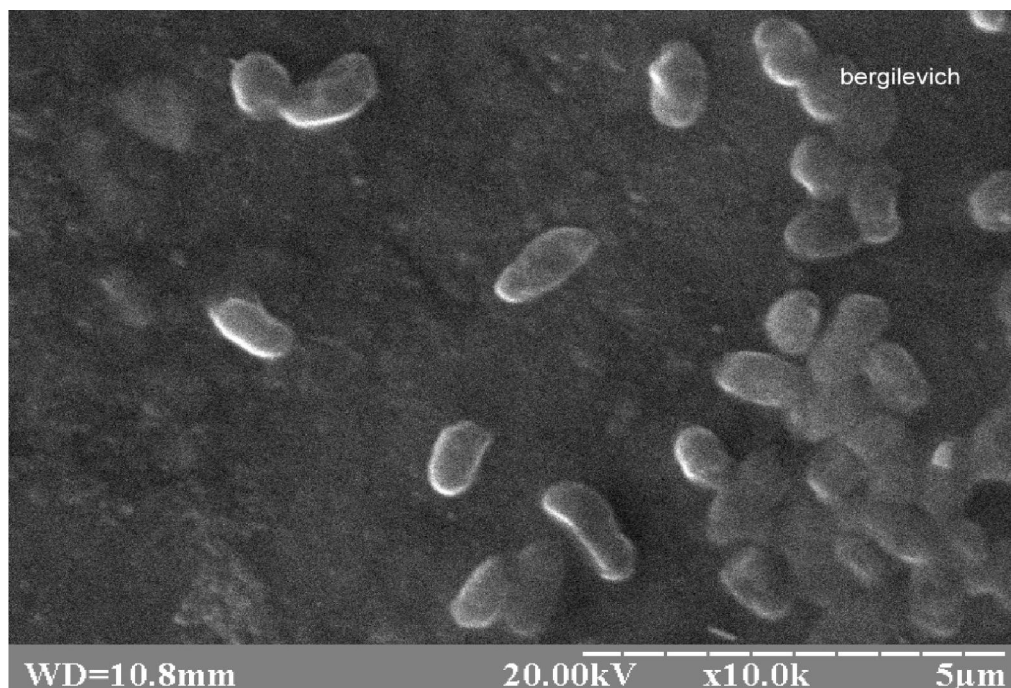


Рисунок 3.4 – Клітини бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) (растровий електронний мікроскоп)

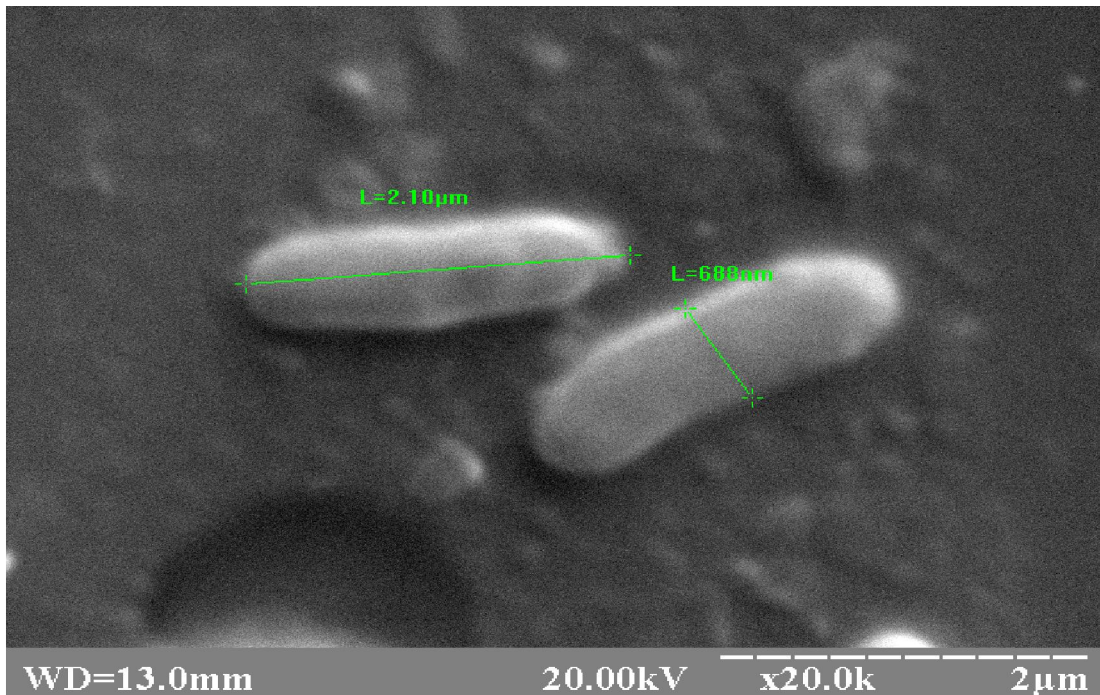


Рисунок 3.5 – Розміри клітин бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* (растровий електронний мікроскоп)

Поверхня бактеріальних клітин *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* рівна, хоча деякі з клітин мали певні вигини. Часто спостерігали з'єднання клітин, які не роз'єдналися після процесу поділу (рис. 3.4, 3.5).

Під час вивчення культуральних властивостей було встановлено, що всі виділені штами бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* росли в аеробних умовах за температури $(36 \pm 1) ^\circ\text{C}$ та $(24 \pm 1) ^\circ\text{C}$, залежно від виду середовища. Було відзначено ріст штамів бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* на таких живильних середовищах: бульйонних збагаченнях для бактерій родини *Enterobacteriaceae* за Масселем, глюкозо-жовчному агарі з кристалічним фіолетовим та нейтральним червоним, середовищі Ендо за температури $(36 \pm 1) ^\circ\text{C}$, а на триптон-соєвому агарі за температури $(24 \pm 1) ^\circ\text{C}$ (табл. 3.10).

Таблиця 3.10 – Культуральні та біохімічні властивості виділених штамів бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*

Показник прояву характерних культуральних властивостей	Кількість досліджуваних штамів бактерій <i>Cronobacter spp. (E. sakazakii)</i> (разом/позитивних)									
	сире молоко		секрет вим'я корів, хворих на субклінічний мастит		змив із доїльних апаратів (гума дійкових стаканів)		змив з молочного танка		змив з підлоги корівника	
Поява росту на бульйоні збагачення для бактерій родини <i>Enterobacteriaceae</i> за Масселем										
Через (14 ± 2) годин	5/4	80	5/3	60	6/5	83	3/0	–	6/4	67
Через (20 ± 2) годин	5/1	20	5/2	40	6/1	17	3/3	100	6/2	33
Ріст на глюкозо-жовчному агарі з кристалічним фіолетовим										
Утворення темно-червоних колоній	5/4	80	5/5	100	6/5	83	3/3	100	6/4	67
Утворення темно-червоних колоній з ореолом навколо них	5/1	20	5/0	–	6/1	17	3/0	–	6/2	33
Утворення жовтих колоній на триптон-соєвому агарі, що мають такі характеристики:										
– гладкі та слизисті	5/3	60	5/4	80	6/6	100	3/3	100	6/4	67
– сухі, гребінчасті	5/2	40	5/1	20	6/0	–	3/0	–	6/2	33
– діаметр колоній 1–2 мм на 24-ту годину культивування,	5/3	60	5/3	60	6/6	100	3/2	67	6/4	67
2–3 мм – на 48-му годину культивування	5/2	40	5/2	40	6/0	–	3/1	33	6/2	33

Таблиця 3.11 – Порівняльна характеристика біохімічних властивостей виділених штамів бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*)

Біохімічний тест	Кількість досліджуваних штамів бактерій <i>Cronobacter spp.</i> (<i>E. sakazakii</i>) (разом/позитивних)														
	сире молоко				секрет вим'я корів, хворих на субклінічний мастит		змив із доїльних апаратів (гума дійкових стаканів)			змив з молочного танка		змив із підлоги корівника			
	1	1	1	2	3	2	1	3	2	2	1	3	2	1	
βD-галактозидаза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Лізіндекарбоксилаза (L-лізин)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	
Орнітіндекарбоксилаза (L-орнітин)	+	±	+	+	±	+	+	+	+	+	+	+	+	±	
Уреаза	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	
Утилізація цитратів	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Парафенілаланіндезаміназа	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	
Утилізація маланату	–	+	±	–	+	±	–	–	–	±	–	–	–	+	
В-глюкозидаза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Ферментація:															
L-арабінози	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
D-ксилози	+	±	+	+	±	+	+	+	+	+	+	+	+	±	
D-адонітолу	–	±	±	–	±	±	–	–	–	±	–	–	–	±	
L-рамнози	+	±	+	+	±	+	+	+	+	+	+	+	+	±	
D-целобіози	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
D-мелібіози	+	±	±	+	±	±	+	+	+	±	+	+	+	±	
D-сахарози	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
D-трегалози	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
D-рафінози	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
D-глюкози	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Індол	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	
Реакція Фогеса – Проскауера	+	±	±	+	±	±	+	+	+	±	+	+	+	±	
Реакція на оксидазу	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	
Ймовірність до видової належності, %	99	85	90	96	85	90	96	99	96	90	96	99	96	85	

Примітка: + – позитивна реакція; – – негативна реакція; ± – слабо виражена реакція

Як бачимо з табл. 3.10, на бульйоні збагачення для бактерій родини *Enterobacteriaceae* за Масселем із 25 досліджуваних штамів бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* у 16 штамів (64,5 %), що становить більшість, ріст було відзначено вже через (14 ± 2) години порівняно з тим, що 9 штамів (35,5 %) виявили ріст не раніше ніж через (20 ± 2) години культивування. Характерними ознаками росту на цьому середовищі для виділених штамів були: зміна зовнішнього вигляду середовища з прозоро-зеленого кольору на мутнувато-жовтий з осадом на дні пробірки та поверхневою плівкою (рис. 3.6).

Під час культивування на глюкозо-жовчному агарі з кристалічним фіолетовим усі досліджувані штами бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* утворювали за температури (36 ± 1) °C темно-червоні колонії на 20–24-ту годину культивування. Проте лише 4 штами із 25 досліджуваних утворювали на цьому середовищі темно-червоні колонії з ореолом навколо них (рис. 3.7).

При культивуванні на триптон-соєвому агарі за температури (24 ± 1) °C 18 штамів бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* (72 %) утворювали колонії жовтого кольору розміром у діаметрі 1–2 мм на 24-ту годину культивування, а 7 штамів (28 %) – колонії діаметром 2–3 мм – на 48-му годину. Було встановлено, що на триптон-соєвому агарі виділені штами виявляли ріст у вигляді двох видів колоній, що, на нашу думку, залежить від індивідуальних особливостей збудника.

Перший вид колоній, які ми виявили, – це сухі з гребінчастою поверхнею, великого розміру, гумоподібної, тягучої консистенції на дотик бактеріологічною петлею (R-форми). Другий вид колоній – це гладенькі, вологі (мукоїдні), округлої форми з рівними краями, які легко можна взяти за допомогою бактеріологічної петлі (S-форми) (рис. 3.8 та 3.9).

Усі досліджувані штами бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* перевіряли за біохімічними властивостями за допомогою RapID 20E-тесту, призначеного для біохімічної ідентифікації мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae*, за 20 показниками впродовж 4 годин. Було встановлено певні відмінності в біохімічних властивостях виділених штамів бактерій *Cronobacter*

spp. (E. sakazakii). У таблиці 3.11 наведено результати вивчення порівняльної характеристики біохімічних властивостей виділених штамів бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*.



Рисунок 3.6 – Ріст бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* на бульйоні збагачення для бактерій родини *Enterobacteriaceae* за Масселем (пробірки № 1–2 характерний ріст, пробірка № 3 – контроль)

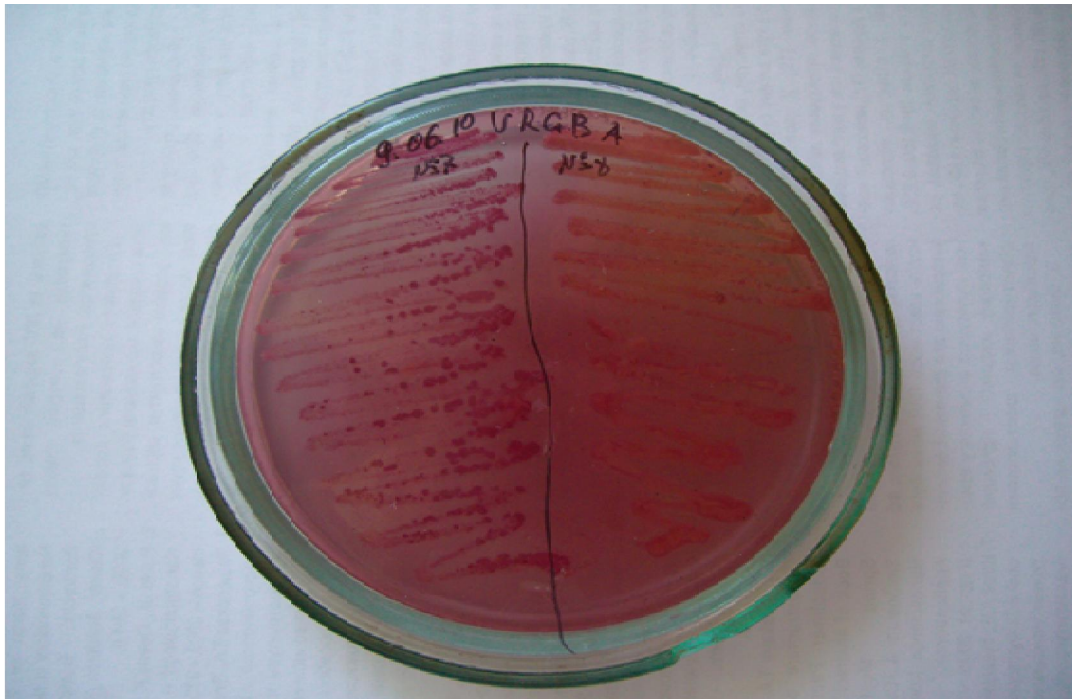


Рисунок 3.7 – Ріст бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* на глюкозо-жовчному агарі з кристалічним фіолетовим (ліва половина чашки – характерні темно-червоні колонії, права половина чашки – нехарактерні колонії)

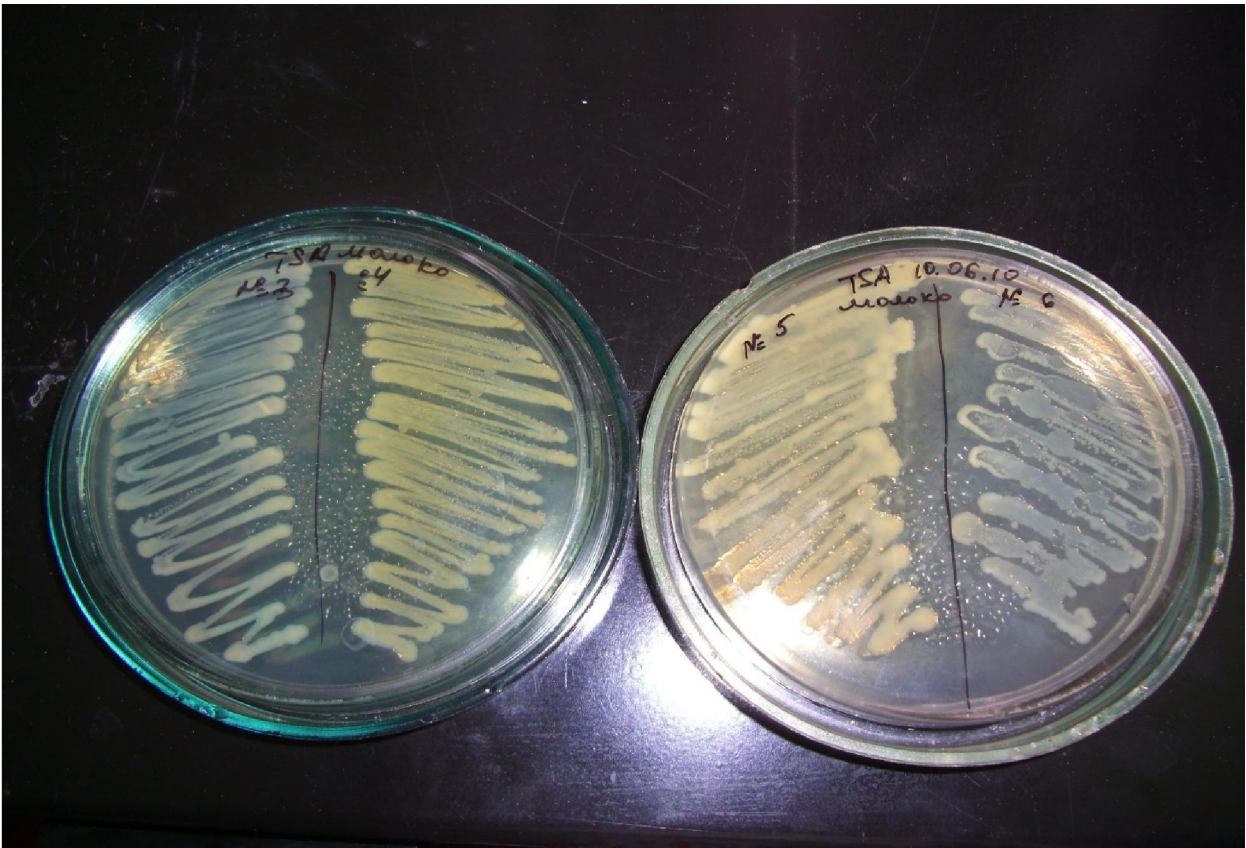
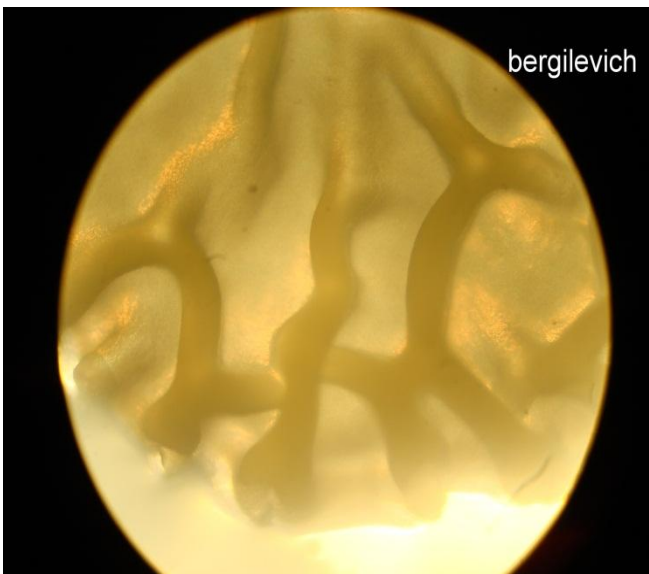
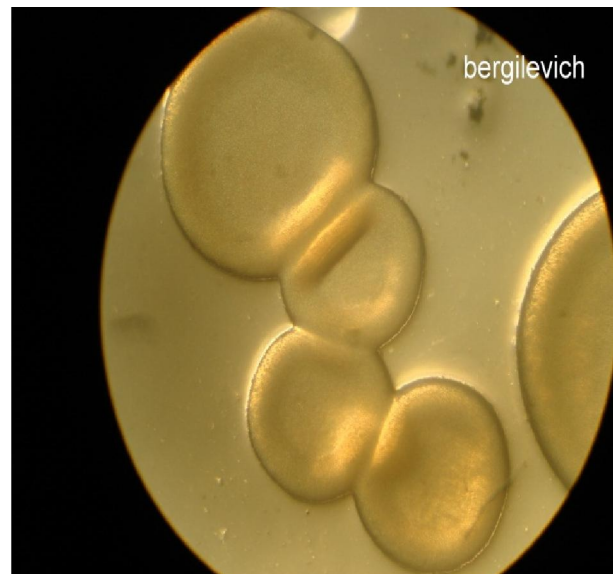


Рисунок 3.8 – Ріст бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) на триптон-соевому агарі (№ 4 та № 5 – характерний ріст, № 3 і № 6 – нехарактерні колонії)



А



Б

Рисунок 3.9 – Зовнішній вигляд колоній, які утворювали виділені штами бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) (А – сухі колонії з гребінчастою поверхнею (R-форми); Б – гладенькі слизисті колонії (S-форми))

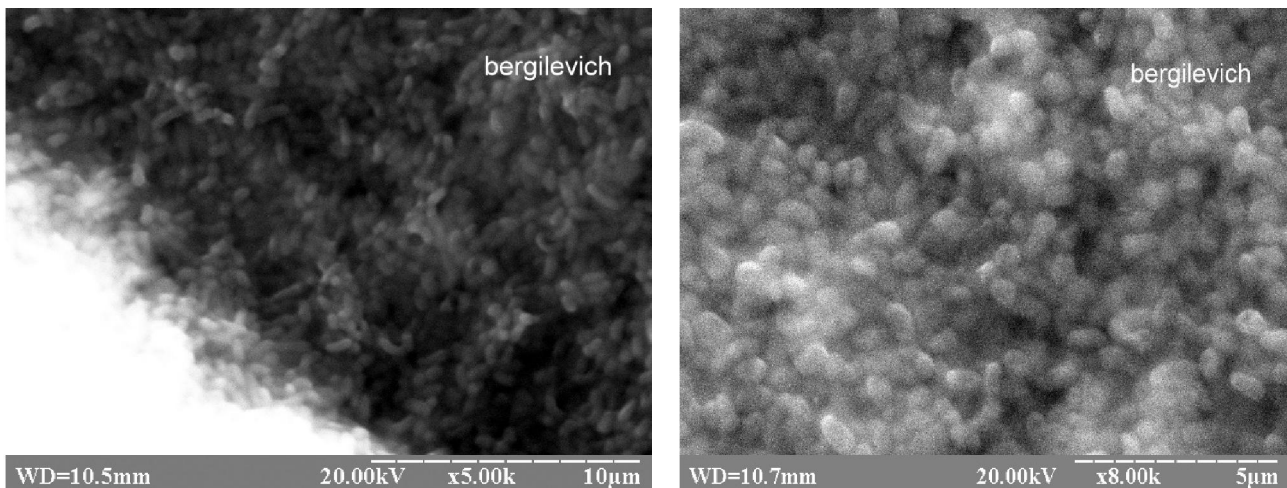


Рисунок 3.10 – Край та поверхня колонії *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* на триптон-соєвому агарі під растровим електронним мікроскопом (щільне розміщення бактеріальних клітин у середині колонії)

Як бачимо з таблиці 3.11, штамів із 99 та 96 % ймовірності мали характерні для виду біохімічні властивості та по 5 штамів – з 90 та 85 % ймовірності. Крім того, всі досліджувані штами бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*, що були виділені із сирого молока та різних об'єктів молочних ферм, мали спільні основні, характерні біохімічні властивості для цього виду бактерій: негативну реакцію на оксидазу та індол, утворення кислоти з арабінози, целобіози, сахарози, трегалози, рафінози та глюкози.

Отже, за результатами проведеної роботи можна зробити висновок, що детально вивчені штами бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* проявляли характерні для виду морфологічні, культуральні та біохімічні властивості, проте мали певні незначні відмінності в рості на живильних середовищах та прояві біохімічних властивостей.

Мікроорганізм утворює жовті колонії на триптон-соєвому агарі. Жовтий пігмент колоній краще утворюється під час культивування мікроорганізму за температури 25 °С, аніж 36 °С. Утворювані колонії мають діаметр 1–2 мм на 24-ту годину культивування та діаметр 2–3 мм – на 48-му годину. При культивуванні за температури 36 °С колонії діаметром 2–3 мм утворюються вже через 24 години [328]. За даними С. Block та ін. (2002), один із

досліджуваних ізолятів *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* не утворював колоній жовтого кольору на триптон-соєвому агарі.

Вивчення терморезистентності виділених штамів бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*. У подальшому ми вивчали терморезистентність 5 штамів бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* в стерильному молоці на дію різних температурних режимів: 58, 60, 64, 68, 70, 72, 74 °С, визначаючи час (у хвиликах) повного знищення бактерій.

Для попередження впливу інших мікроорганізмів молока та для чистоти досліду ми використовували молоко корів, що було термічно оброблене за температури 100 °С. До охолодженого до 37 °С стерильного молока додавали досліджувані штами бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* кількістю 1 см³, перемішували та піддавали різному температурному впливу на водяній бані за температур 58, 60, 62, 64, 66, 68 °С.

Результати проведеної роботи наведено на рис. 3.12.

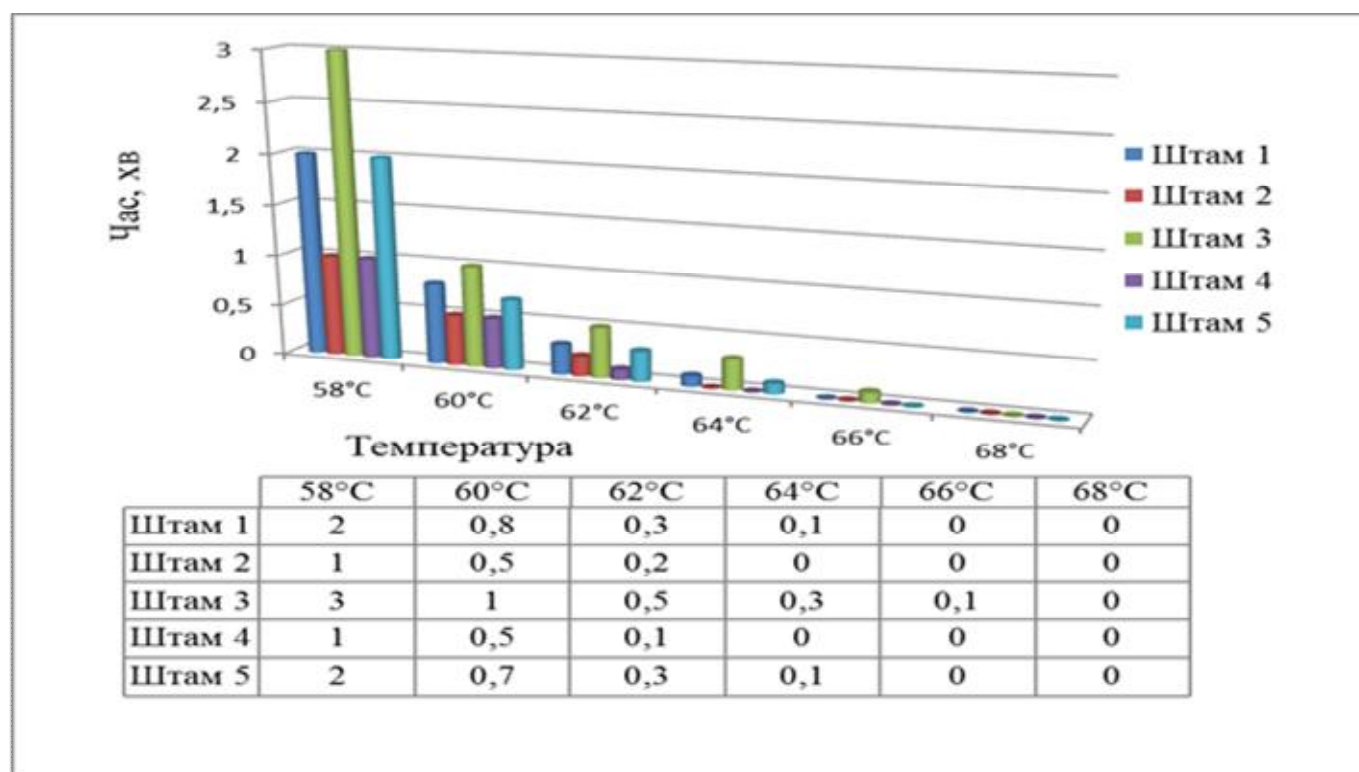


Рисунок 3.11 – Терморезистентність виділених штамів бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*

Як бачимо з рис. 3.11, штами бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* відрізнялися терморезистентністю. Було встановлено, що з підвищенням температури від 58 до 68 °С терmostійкість штамів знижувалася. Штам 3 проявив себе як такий, що має добре виражену терморезистентність, оскільки він витримував дію температури 58 °С упродовж 3 хв на відміну від інших, які гинули впродовж 1–2 хв за цієї самої температури. Також цей штам, один із п'яти досліджуваних, витримував дію температури 66 °С упродовж 1 хвилини. Найбільш руйнівною для всіх досліджуваних штамів бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* була температура 68 °С.

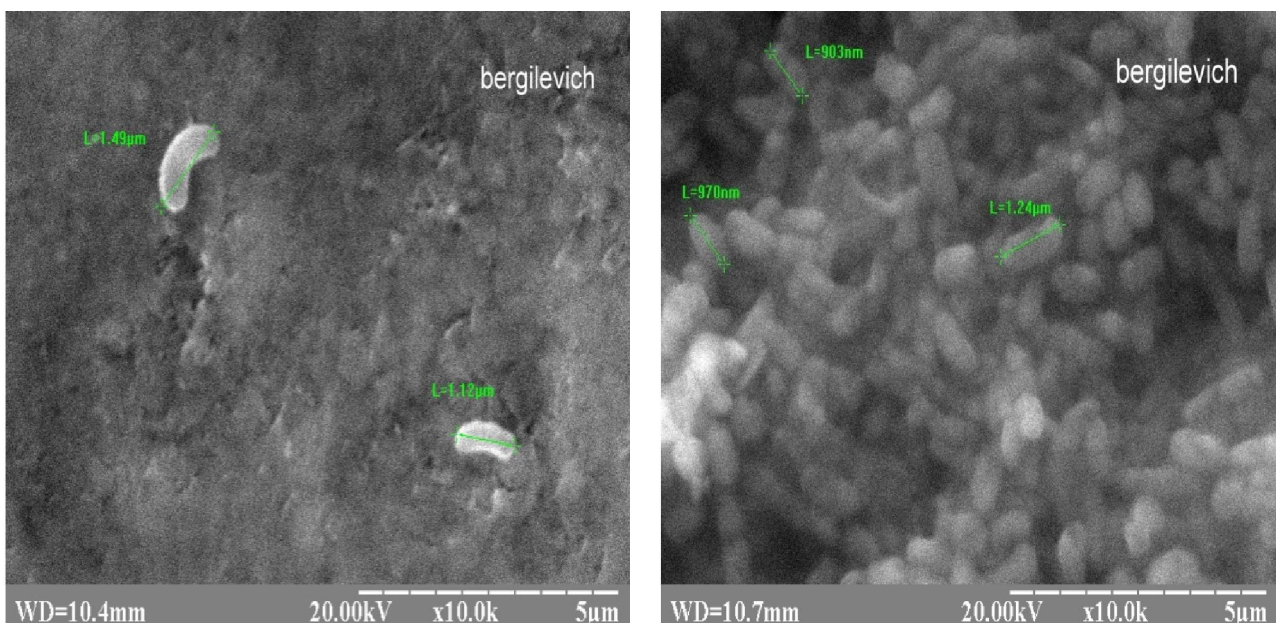
У цій серії досліджень ми визначили такий важливий показник для характеристики бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*, як терморезистентність. Результати досліджень свідчать про те, що ці мікроорганізми мають невисоку стійкість до високих температур. Результати одержаних даних можуть бути основою для розроблення запобіжних заходів щодо попередження потрапляння бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* до готових молокопродуктів.

Депонування штаму бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* M1. Із виділених та детально вивчених штамів бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* було відібрано один, який уперше в Україні був виділений із сирого збірного молока корів і одержав назву *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* M1. Цей штам мав добре виражені та стабільні морфологічні, культуральні й біохімічні властивості, характерні для цього виду мікроорганізмів, що дало підґрунтя для проведення його депонування в колекції Національного центру штамів мікроорганізмів Державного науково-контрольного інституту біотехнології та штамів мікроорганізмів (м. Київ). Було проведені виробничі випробування штаму бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* M1: підтвердження стабільності його властивостей шляхом 5-разового послідовного його пересівання на живильні середовища з подальшим вивченням морфологічних, культуральних та біохімічних властивостей.

*Морфологічні властивості штаму бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* M1.* У мазках із бульйонних та агарових культур штам

Cronobacter spp. (*E. sakazakii*) M1 мав вигляд коротких грам-негативних паличок із заокругленими кінцями без спор та капсул. Було встановлено, що розміри бактеріальних клітин, розміщених поодинокі, становили 1,12–1,49 x 0,5–1,0 мкм (рис. 3.12 А), а в скупченнях розміри були значно меншими – 0,9–1,2 x 0,2–0,4 мкм (рис. 3.12 Б). Під час детального вивчення бактеріальних популяцій (колоній) штаму *Cronobacter* spp. (*E. sakazakii*) M1 в сканувальному електронному мікроскопі було виявлено щільно розміщені клітини, через які складно було виявляти окремі мікроорганізми.

Культуральні властивості штаму бактерій *Cronobacter* spp. (*E. sakazakii*) M1. Штам виявляв ріст в аеробних умовах на рідких та густих середовищах для мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* за оптимальних температур 36–38 °С: бульйонні збагачення для бактерій родини *Enterobacteriaceae* за Масселем, глюкозо-жовчному агарі з кристалічним фіолетовим та нейтральним червоним, триптон-соєвому агарі.



А

Б

Рисунок 3.12 – Клітини *Cronobacter* spp. (*E. sakazakii*) під растровим електронним мікроскопом (А – поодинокі клітини; Б – скупчення клітин)

Під час культивування на бульйоні збагачення для бактерій родини *Enterobacteriaceae* за Масселем ріст штаму відзначався у вигляді помутніння бульйону та зміни кольору бульйону із зеленуватого на жовтуватий.

Під час культивування на глюкозо-жовчному агарі з кристалічним фіолетовим утворював пурпурні колонії за температури 36 °C на 24-ту годину культивування.

При культивуванні на триптон-соевому агарі за температури 25 °C утворював гладкі мукоїдні (S-форми) колонії жовтого кольору діаметром 1–2 мм на 24-ту годину культивування та діаметром 2–3 мм – на 48-му годину.

Біохімічні властивості бактерій *Enterobacter sakazakii* M1 були характерними для мікроорганізмів цього виду, визначені за визначником Берджі: оксидазонегативні, утворюють кислоту (ферментація) з глюкози, сахарози, арабінози та інших цукрів, мають негативну реакцію на індол (рис. 3.13).



Рисунок 3.13 – Біохімічні властивості штаму бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) M1 за допомогою RapID 20E-тесту для біохімічної ідентифікації мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae*

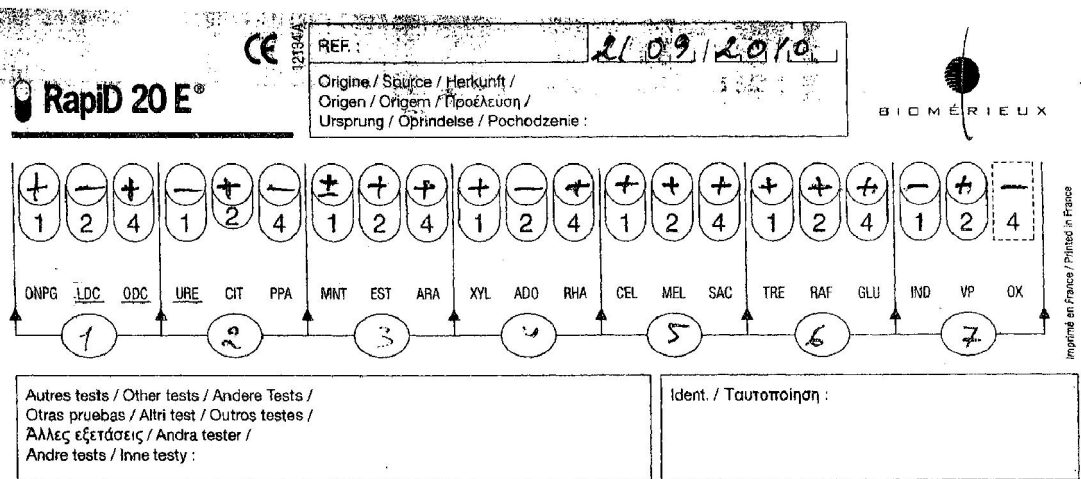


Рисунок 3.14 – Протокол результатів вивчення біохімічних властивостей штаму бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* M1 за допомогою RapiD 20E-тесту для біохімічної ідентифікації мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae*

Нижче в таблиці 3.12 наведено результати щодо рис 3.14.

Таблица 3.12 – Біохімічні властивості штаму бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* M1 (результати RapiD 20E-тесту)

Тест	Штам бактерій <i>Cronobacter spp. (E. sakazakii)</i> M1
1	2
βD-галактозидаза	+
Лізіндекарбоксилаза (L-лізин)	-
Орнітіндекарбоксилаза (L-орнітин)	+
Уреаза	-
Утилізація цитратів	+
Парафенілаланіндезаміназа	-
Утилізація маланату	-
В-глюкозидаза	+

Продовження таблиці 3.12

1	2
Ферментація (утворення кислоти):	
L-арабінози	+
D-ксилози	+
D-адонітолу	–
L-рамнози	+
D-целобіози	+
D-мелібіози	+
D-сахарози	+
D-трегалози	+
D-рафінози	+
D-глюкози	+
Індол	–
Реакція Фогеса – Проскауера	+
Реакція на оксидазу	–
Ймовірність до видової належності, встановленої програмою	99 %

Примітка: + – позитивна реакція; – – негативна реакція

Для повної характеристики цього штаму ми вивчили його чутливість до антибактеріальних препаратів. Результати цієї роботи наведені в табл. 3.13.

Як бачимо з табл. 3.13, досліджуваний штам бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) M1 був чутливий до лінкоміцину, помірно стійкий – до олеандоміцину, левоміцетину, цефотаксиму. Штам бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) M1 виявився резистентним до більшості використаних у досліді антибактеріальних препаратів, а саме: ванкоміцину, еритроміцину, неоміцину, енроксилу, рифампіцину, налідиксової кислоти.

Таблиця 3.13 – Результати вивчення чутливості штаму бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* М1 до антибактеріальних препаратів ($M \pm m, n = 7$)

Антибактеріальний препарат	Діаметр зон пригнічення росту мікроорганізму, мм	Чутливість
Налідиксова кислота	$35 \pm 0,67$	Резистентний
Рифампіцин	$35 \pm 0,34$	Резистентний
Енроксил	$34 \pm 0,12$	Резистентний
Неоміцин	$34 \pm 0,22$	Резистентний
Еритроміцин	$30 \pm 0,54$	Резистентний
Ванкоміцин	$30 \pm 0,43$	Резистентний
Цефотаксим	$17 \pm 0,22$	Помірно стійкий
Левоміцитин	$15 \pm 0,24$	Помірно стійкий
Олеандоміцин	$12 \pm 0,56$	Помірно стійкий
Лінкоміцин	$10 \pm 0,14$	Чутливий

Результати проведеної роботи, які висвітлені в цьому розділі, є внеском у депонування штаму бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* М1. Уперше в Україні задепоновано цей вид мікроорганізму в колекції Національного центру штамів мікроорганізмів Державного науково-контрольного інституту біотехнології та штамів мікроорганізмів (м. Київ) з реєстраційним номером 503 (Свідоцтво на штам від 17.11.2010 р.).

Установлення взаємозв'язку між загальною кількістю мікроорганізмів у сирому збірному молоці, кількістю мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* і бактеріями *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*. Встановлення взаємозв'язку між загальною кількістю мікроорганізмів (КМАФАнМ) у сирому збірному молоці, кількістю мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* і бактеріями *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* є дуже важливим

показником для використання в такій складовій ОМР як «Характеристика небезпеки». Визначення КМАФАнМ можна проводити швидким тестом за допомогою редуктазних проб, крім того, цей показник визначається регулярно при здаванні-прийманні молока. Знаючи загальну кількість мікроорганізмів у молоці та взаємозв'язок її з кількістю бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*, можна одержати значення кількості бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* в молоці за допомогою нескладних розрахунків.

Ураховуючи особливу небезпеку бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* для дітей, в цьому підрозділі описане дослідження сирого молока, що належить до вищих гатунків за градацією чинного ДСТУ 3662-97, оскільки лише таке молоко використовують для виробництва продуктів дитячого харчування.

Ми дослідили взаємозв'язок рівня контамінації сирого збірного молока гатунків екстра та вищій мікроорганізмами родини *Enterobacteriaceae* та бактеріями *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* на різних етапах його виробництва.

Установлення взаємозв'язку між зазначеними кількостями мікроорганізмів ми визначали з метою одержання даних щодо поширення мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* та бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* в складі КМАФАнМ. Дослідження проводили з урахуванням впливу на досліджувані мікроорганізми, умов зберігання і транспортування.

Спочатку ми встановлювали цей взаємозв'язок під час зберігання молока охолодженим на фермі впродовж 12 і 24 годин. Досліджували молоко неохолоджене відразу після його збирання та за умов його зберігання за температур охолодження 4, 6, 8 °С. Результати проведеної роботи наведено в табл. 3.14.

Таблиця 3.14 – Встановлення взаємозв'язку між загальною кількістю мікроорганізмів, кількістю мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* та бактеріями *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) при зберіганні молока охолодженим на фермі ($M \pm m$, $n = 347$)

Гатунок	Кількість проб молока	Показник			
		КМАФАнМ, тис. КУО/см ³	мікроорганізми родини <i>Enterobacteriaceae</i> , тис. КУО/см ³ (%)	бактерії <i>Cronobacter spp.</i> (<i>E. sakazakii</i>), КУО/см ³ (%)	співвідношення <i>Enterobacteriaceae/Cronobacter spp.</i> (<i>E. sakazakii</i>)
1	2	3	4	5	6
Збірне молоко, неохолоджене відразу після збирання на фермі					
«Екстра»	30	58 ± 1,2	5,8 ± 0,1 (10 %)	3 ± 1 (0,01 %)	1:1930
«Вищий»	33	120 ± 3,1	16,8 ± 0,2 (14 %)	19 ± 3 (0,1 %)	1:800
Збірне молоко, охолоджене до 4 °С, після 12 годин зберігання на фермі					
«Екстра»	30	57 ± 12,8*	6,8 ± 1,7* (12 %)	5 ± 0,5 (0,01%)	1:1360
«Вищий»	29	112 ± 12,9**	17,9 ± 5,1 (15 %)	22 ± 2,7* (0,2 %)	1:768
Збірне молоко, охолоджене до 4 °С, після 24 годин зберігання на фермі					
«Екстра»	29	63 ± 13,7	8,8 ± 1,7* (14 %)	8 ± 2,3* (0,1 %)	1:1100
«Вищий»	29	153 ± 31,2	29,1 ± 9,8* (19 %)	46 ± 14,1 (0,1 %)	1:632
Збірне молоко, охолоджене до 6 °С, після 12 годин зберігання на фермі					
«Екстра»	29	62 ± 11,7	8,1 ± 0,9 (13 %)	8 ± 2,5** (0,1 %)	1:1013
«Вищий»	30	157 ± 22,8	26,7 ± 9,2 (17 %)	80 ± 31,2 (0,3 %)	1:334
Збірне молоко, охолоджене до 6 °С, після 24 годин зберігання на фермі					
«Екстра»	22	69 ± 12,6*	10,4 ± 1,8* (15 %)	20 ± 2,6* (0,2 %)	1:520
«Вищий»	20	198 ± 31,4	41,7 ± 15,2 (21 %)	208 ± 32 (0,5 %)	1:200
Збірне молоко, охолоджене до 8 °С, після 12 годин зберігання на фермі					
«Екстра»	15	75 ± 1,7*	15,0 ± 1,9* (20 %)	75 ± 19,2 (0,5 %)	1:200

Продовження таблиці 3.14

1	2	3	4	5	6
«Вищий»	18	252 ± 27,1	57,8 ± 12,1 (23 %)	577 ± 15 (1 %)	1:100
Збірне молоко, охолоджене до 8 °С, після 24 годин зберігання на фермі					
«Екстра»	15	80 ± 12,6*	16,0 ± 1,1 (20 %)	144 ± 27,4 (0,9 %)	1:111
«Вищий»	18	279 ± 63,5*	75,3 ± 9,4 (27 %)	1130 ± 42,3 (1,5 %)	1:67

Примітка: в колонці 4 (%) – відносна кількість до КМАФАнМ, у колонці 5 (%) – відносна кількість до мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae*; * – $p \leq 0,05$, ** – $p \leq 0,01$ – щодо показників неохолодженого молока

Як бачимо з даних, наведених у табл. 3.14, можна простежити чітку динаміку збільшення кількості досліджуваних мікроорганізмів у сирому молоці під час охолодження. Дані табл. 3.14 також свідчать про те, що в молоці гатунку вищий до охолодження міститься в середньому втричі більше мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* порівняно з їх кількістю в молоці гатунку «екстра», а бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* – більше ніж у 6 разів. Тобто молоко, що містить більше ніж 100 тис. КУО/см³ КМАФАнМ, становить більший ризик щодо бактерії *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* порівняно з молоком, в якому значення КМАФАнМ менше ніж 100 тис. КУО/см³.

Під час зберігання молока за температури 4 °С впродовж 12 годин зростання мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* та бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* відбувалося незначно, в середньому на 2 % ($p \leq 0,05$) та на 2 КУО/см³ відповідно, а показник КМАФАнМ навіть зменшувався порівнянно з такими показниками неохолодженого молока. Зменшення КМАФАнМ в молоці гатунку «екстра» за цих умов зберігання відбувалося в середньому на 1 тис. КУО/см³ ($p \leq 0,05$) при зберіганні молока охолодженим за температури 4 °С впродовж 12 годин. Проте під час зберігання молока охолодженим за цієї температури впродовж 24 годин їх кількість збільшилася на 5 тис. КУО/см³. Мікроорганізми родини *Enterobacteriaceae* в охолодженому молоці гатунку «екстра» за 12 годин зберігання збільшили свою

кількість у середньому на 1 тис. КУО/см³ ($p \leq 0,05$), а після 24 годин охолодження молока – на 3 тис. КУО/см³ ($p \leq 0,05$). Що ж стосується бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*, то їх кількість за вищезазначених умов зберігання в молоці гатунку екстра зросла в середньому на 2 та 3 КУО/см³ ($p \leq 0,05$) відповідно.

Що стосується динаміки мікроорганізмів у сирому збірному молоці вищого гатунку, то вона була такою: КМАФАнМ через 12 годин зберігання за температури 4 °С зменшилася на 8 тис. КУО/см³ ($p \leq 0,01$) порівнянно з КМАФАнМ у неохоложеному молоці, а після 24 – у середньому збільшилася на 33 тис. КУО/см³. Кількість мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* зростала порівняно з кількістю в неохоложеному молоці в середньому на 1 тис. КУО/см³ після 12 годин зберігання і на 10 тис. КУО/см³ ($p \leq 0,05$) – після 24 години зберігання. Кількість бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* теж збільшилася на 3 до 27 КУО/см³.

Більшою мірою відбувалося зростання кількості мікроорганізмів у молоці досліджуваних гатунків за температури зберігання 6 °С. Через 12 годин зберігання молока гатунку екстра за температури 6 °С кількість МАФАнМ зростала в середньому на 4 тис. КУО/см³ порівняно з їх кількістю до охолодження. У молоці вищого гатунку кількість МАФАнМ порівняно з цим значенням до охолодження збільшувалася в середньому на 37 тис. КУО/см³.

Що ж стосується кількості мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* в молоці за умови його зберігання за температури 6 °С упродовж 12 годин, то можна зазначити, що їх кількість збільшувалася порівняно з початковим рівнем у неохоложеному молоці гатунку екстра в середньому на 2,3 тис. КУО/см³, а в молоці вищого гатунку – майже на 10 тис. КУО/см³. Кількість бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* під час зберігання молока впродовж 12 годин за температури 6 °С збільшувалася в молоці гатунку «екстра» в середньому на 5 КУО/см³ ($p \leq 0,01$), а в молоці вищого гатунку – на 61 КУО/см³ щодо їх початкової кількості в неохоложеному молоці.

Під час зберігання молока гатунків «екстра» і «вищий» за умов охолодження до 6 °С впродовж 24 годин було відзначене збільшення КМАФАнМ втричі ($p \leq 0,05$), кількості мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* – у 8 разів, а кількості бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) – у 70 разів.

Особливо інтенсивно відбувалося збільшення кількості всіх вищезазначених мікроорганізмів при зберіганні молока за умови його охолодження до температури 8 °С. Через 12 годин зберігання молока гатунку «екстра» за цієї температури кількість МАФАнМ, мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* та бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) збільшувалася в середньому на 17; 9,2 і 72 КУО/см³ відповідно. У молоці вищого гатунку ці показники мають такі відповідні значення: 194, 52 та 574 КУО/см³.

Результати досліджень щодо вмісту досліджених нами мікроорганізмів у сирому молоці під час зберігання свідчать, що із збільшенням температури охолодження і терміну зберігання молока їх кількість зростає. Якщо проаналізувати динаміку збільшення кількості бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) під час зберігання в молоці гатунку «екстра», то максимальне їх значення – 144 КУО/см³ – було за температури зберігання 8 °С упродовж 24 годин, а в молоці вищого гатунку за цих умов їх кількість була в межах 1 130 КУО/см³.

Одержані в даному випадку значення кількості бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) досить високі, тому за таких показників необхідно особливу увагу приділяти умовам їх інактивації під час пастеризації.

Проаналізовані дані табл. 3.14 будуть неповними, якщо не провести детального порівняння кількості МАФАнМ, мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* та бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) в сирому молоці до охолодження та під час його зберігання охолодженим. Результати обчислення кількісного співвідношення досліджуваних мікроорганізмів у молоці узагальнено в табл. 3.15.

Дані таблиці 3.15 свідчать про те, що до КМАФАнМ мікроорганізми родини *Enterobacteriaceae* в сирому молоці при зберіганні співвідносяться як 1 до 0,001–0,2, а бактерії *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* як 1 до 0,0002–0,004. При цьому перехід від десятинних значень до тисячних відзначається в молоці гатунку «екстра» при зберіганні його за температури 8 °С, а в молоці вищого гатунку – за температури 6 та 8 °С.

Таблиця 3.15 – Узагальнення взаємозв'язку між кількістю МАФАнМ, мікроорганізмами родини *Enterobacteriaceae* та бактеріями *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* в сирому молоці під час зберігання (n = 347)

Параметр молока	Співвідношення КМАФАнМ до мікроорганізмів родини <i>Enterobacteriaceae</i> та бактерій <i>Cronobacter spp. (E. sakazakii)</i>	
	молоко гатунку «екстра»	молоко гатунку «вищий»
Неохолоджене	1:0,001:0,00005	1:0,14:0,00016
Охолоджене до: 4 °С, 12 годин	1:0,12:0,00009	1:0,16:0,00020
4 °С, 24 години	1:0,14:0,00013	1:0,19:0,0003
6 °С, 12 годин	1:0,13:0,00013	1:0,17:0,00051
6 °С, 24 години	1:0,15:0,0003	1:0,21:0,001
8 °С, 12 годин	1:0,2:0,001	1:0,23:0,002
8 °С, 24 години	1:0,2:0,002	1:0,27:0,004

Це співвідношення між досліджуваними групами мікроорганізмів молока під час охолодження можна використовувати для обчислення середніх кількостей як мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae*, так і бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* в ньому для встановлення мікробіологічного ризику як допоміжний орієнтовний метод.

Наступний етап, де ми встановлювали взаємозв'язок рівня контамінації сирого збірного молока гатунку «екстра» та «вищий» мікроорганізмами родини

Enterobacteriaceae та бактеріями *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*), – це транспортування збірного молока охолодженим за температури від 4 до 8 °С упродовж 30 або 60 хв. Результати проведеної роботи наведено в таблицях 3.16–3.18.

Таблиця 3.16 – Встановлення взаємозв'язку між загальною кількістю мікроорганізмів, кількістю мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* та бактеріями *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) під час транспортування збірного молока охолодженим до 4 °С (M ± m, n = 214)

Гатунок	Кількість проб молока	Показник			
		КМАФАнМ, тис. КУО/см ³	мікроорганізми родини <i>Enterobacteriaceae</i> , тис. КУО/см ³ (%)	бактерії <i>Cronobacter spp.</i> (<i>E. sakazakii</i>), КУО/см ³ (%)	співвідношення <i>Enterobacteriaceae</i> / <i>Cronobacter spp.</i> (<i>E. sakazakii</i>)
1	2	3	4	5	6
Збірне молоко, охолоджене до 4 °С (після 12 годин зберігання на фермі), транспортування впродовж 25–30 хв					
«Екстра»	22	58 ± 5,7**	7,0 ± 1,8* (12 %)	7 ± 2,2* (0,1 %)	1:1000
«Вищий»	25	115 ± 12,1	17,3 ± 1,3 (15 %)	35 ± 4,3* (0,2 %)	1:500
Збірне молоко, охолоджене до 4 °С (після 12 годин зберігання на фермі), транспортування впродовж 30–60 хв					
«Екстра»	24	65 ± 9,9**	8,0 ± 2,1* (14 %)	8 ± 2,0* (0,1 %)	1:1000
«Вищий»	28	175 ± 12,7*	30,7 ± 9,8** (19 %)	62 ± 10 (0,3 %)	1:495
Збірне молоко, охолоджене до 4 °С (після 24 годин зберігання на фермі), транспортування впродовж 25–30 хв					
«Екстра»	26	64 ± 5,8**	8,8 ± 1,8* (13 %)	8 ± 2,2* (0,1 %)	1:1000
«Вищий»	27	154 ± 12,8*	29,9 ± 11,3 (17 %)	63 ± 12,7* (0,2 %)	1:475

Продовження таблиці 3.16

1	2	3	4	5	6
Збірне молоко, охолоджене до 4 °С (після 24 годин зберігання на фермі), транспортування впродовж 30–60 хв					
«Екстра»	35	69 ± 9,7**	9,9 ± 1,8 * (14 %)	10 ± 4,3* (0,2 %)	1:990
«Вищий»	27	210 ± 63,5**	35,3 ± 1,4 (20 %)	75 ± 12,7* (0,3 %)	1:470

Примітка: в колонці 4 (%) – відносна кількість до КМАФАнМ, у колонці 5 (%) – відносна кількість до мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae*; * – $p \leq 0,05$, ** – $p \leq 0,01$ – щодо показників охолодженого молока, яке зберігалось на фермі, наведених у табл. 3.14

Як бачимо з таблиці 3.16, при транспортуванні збірного молока гатунку «екстра» за температури 4 °С за умови, якщо воно попередньо зберігалось на фермі охолодженим упродовж 12 годин, кількість МАФАнМ у середньому збільшилася на 1 тис. КУО/см³ ($p \leq 0,05$) під час транспортування молока впродовж 25–30 хв і на 7 тис. КУО/см³ ($p \leq 0,01$) – під час транспортування молока впродовж 30–60 хв. Кількість мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* в цьому випадку у відносному значенні в середньому збільшилася на 2–4 % ($p \leq 0,05$) залежно від часу транспортування. Кількість бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* теж збільшилася в середньому на 4–5 КУО/см³ ($p \leq 0,05$). Співвідношення бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* до кількості мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* зменшилося з 1:1930 до 1:1000.

Під час транспортування збірного молока гатунку «екстра» за температури 4 °С за умови, якщо воно попередньо зберігалось на фермі охолодженим упродовж 24 годин, були одержані такі дані: кількість МАФАнМ у середньому збільшилася на 1 тис. КУО/см³ ($p \leq 0,01$) через 25–30 хв транспортування і на 6 тис. КУО/см³ ($p \leq 0,01$) – через 30–60 хв транспортування щодо цих показників після зберігання на фермі. Відносна кількість мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae*, в цьому випадку теж збільшилася, але незначно, лише в середньому на 1 %, що в абсолютному вираженні становить 0,1 тис. КУО/см³ ($p \leq 0,05$).

Кількість бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* в збірному охолодженому молоці після транспортування впродовж 25–30 хв залишалася незмінною, а після транспортування такого молока впродовж 30–60 хв – збільшилася в середньому на 2 КУО/см³ (0,2 %). Співвідношення бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* до кількості мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* становило від 1:1000 до 1:990.

Якщо проаналізувати дані таблиці 3.16, стосовно транспортування збірного молока вищого ґатунку за температури 4 °С за умови його попереднього зберігання на фермі охолодженим упродовж 12 годин, то маємо такі дані. Кількість МАФАНМ у середньому збільшилася на 3 тис. КУО/см³ ($p \leq 0,01$) через 25–30 хв транспортування, а при транспортуванні впродовж 30–60 хв – на 6 тис. КУО/см³ ($p \leq 0,01$). Поряд із цим збільшується й кількість мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae*, але за умови транспортування молока вищого ґатунку впродовж 30–60 хв на 4 % у відносному значенні, або на 13 тис. КУО/см³ – в абсолютному ($p \leq 0,01$). Кількість бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* при цьому була ймовірною ($p \leq 0,05$) і в середньому становила 7–8 КУО/см³, а їх співвідношення до кількості мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* становило 1:500–1:495 в обох випадках транспортування.

Під час транспортування збірного молока вищого ґатунку за температури 4 °С за умови, якщо воно попередньо зберігалось на фермі охолодженим упродовж 24 годин, були одержані такі дані: кількість МАФАНМ у середньому збільшилася на 2 тис. КУО/см³ через 25–30 хв транспортування і на 57 тис. КУО/см³ ($p \leq 0,05$) – через 30–60 хв транспортування щодо цих показників після зберігання на фермі. Відносна кількість мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* залишилася майже незмінною за умови транспортування молока впродовж 25–30 хвилин, проте відзначали збільшення цих мікроорганізмів на 4 %, що в абсолютному вираженні становить 6 тис. КУО/см³ ($p \leq 0,01$).

Під час аналізування результатів, наведених в таблиці 3.17, при транспортуванні збірного молока гатунку «екстра» за температури 6 °С за умови, якщо воно попередньо зберігалось на фермі охолодженим упродовж 12 годин, кількість МАФАНМ була ймовірною ($p \leq 0,05$) порівняно з таким показником при зберіганні молока охолодженим на фермі і збільшилася на 1 тис. КУО/см³ (через 25–30 хв) на 6 тис. КУО/см³ – через 30–60 хв.

Таблиця 3.17 – Встановлення взаємозв'язку між загальною кількістю мікроорганізмів, кількістю мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* та бактеріями *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) під час транспортування збірного молока охолодженим до 6 °С ($M \pm m$, $n = 177$)

Гатунок	Кількість проб молока	Показник			
		КМАФАНМ, тис. КУО/см ³	мікроорганізми родини <i>Enterobacteriaceae</i> , тис. КУО/см ³ (%)	бактерії <i>Enterobacter sakazakii</i> , КУО/см ³ (%)	співвідношення <i>Enterobacteriaceae</i> / <i>Cronobacter spp.</i> (<i>E. sakazakii</i>)
1	2	3	4	5	6
Збірне молоко, охолоджене до 6 °С (після 12 годин зберігання на фермі), транспортування впродовж 25–30 хв					
«Екстра»	20	63 ± 12,6*	8,5 ± 1,8* (13 %)	9 ± 1,9* (0,1 %)	1:944
«Вищий»	25	162 ± 22,5*	29,2 ± 7,1 (18 %)	87 ± 12,1 (0,3 %)	1:337
Збірне молоко, охолоджене до 6 °С (після 12 годин зберігання на фермі), транспортування впродовж 30–60 хв					
«Екстра»	19	68 ± 12,7*	9,5 ± 1,7* (14 %)	19 ± 4,3* (0,2 %)	1:500
«Вищий»	25	168 ± 19,9**	31,5 ± 10,1 (19 %)	95 ± 18,5 (0,3 %)	1:336
Збірне молоко, охолоджене до 6 °С (після 24 годин зберігання на фермі), транспортування впродовж 25–30 хв					

Продовження таблиці 3.17

1	2	3	4	5	6
«Екстра»	22	71 ± 5,8**	12,1 ± 3,1 (17 %)	29 ± 7,3 (0,2 %)	1:417
«Вищий»	22	233 ± 63,7**	55,5 ± 9,1 (24 %)	277 ± 16,8 (0,5 %)	1:200
Збірне молоко, охолоджене до 6 °С (після 24 годин зберігання на фермі), транспортування впродовж 30–60 хв					
«Екстра»	22	73 ± 9,8**	13,1 ± 0,9 (18 %)	39 ± 5,7 (0,3 %)	1:336
«Вищий»	22	294 ± 58,7**	76,5 ± 21,1 (26 %)	389 ± 29,4 (0,5 %)	1:196

Примітка: в колонці 4 (%) – відносна кількість до КМАФАнМ, у колонці 5 (%) – відносна кількість до мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae*; * – $p \leq 0,05$, ** – $p \leq 0,01$ – щодо показників охолодженого молока, яке зберігалось на фермі, наведених у табл. 3.14

Якщо ж збірне охолоджене молоко гатунку «екстра» зберігали на фермі за температури 6 °С упродовж 24 годин, то показники КМАФАнМ збільшувалися на 9 тис. КУО/см³ ($p \leq 0,01$) і 11 тис. КУО/см³ ($p \leq 0,01$) відповідно до часу транспортування.

Кількість мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* теж відрізнялася і залежала від часу зберігання молока гатунку «екстра» на фермі та часу його транспортування. Під час транспортування молока впродовж 25–30 хв цей показник залишався на тому самому рівні (збільшився на 400 КУО/см³), а під час транспортування молока впродовж 30–60 хв – збільшився на 1,4 тис. КУО/см³. Кількість бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) істотно збільшувалася з часом транспортування молока з (9 ± 1,9) КУО/см³ ($p \leq 0,05$) під час транспортування молока впродовж 25–30 хв до (19 ± 4,3) КУО/см³ ($p \leq 0,05$) – впродовж 30–60 хв, а їх співвідношення до кількості мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* становило 1:944–1:500 і 1:417–1:336 відповідно.

Під час транспортування збірного молока вищого гатунку за температури 6 °С, одержані дані, які теж залежали від температури й терміну попереднього зберігання молока на фермі охолодженням та часу транспортування. Загальна кількість МАФАНМ у середньому збільшилася на 5 тис. КУО/см³ через 25–30 хв транспортування молока, яке зберігали охолодженням на фермі 12 годин, на 11 тис. КУО/см³ – через 30–60 хв транспортування молока, яке зберігали охолодженням на фермі 12 годин.

Відносна кількість мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* при цьому була в межах 18–19 та 24–26 % що на 1–2 і 7–9 % більше. Співвідношення бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* до кількості мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* становило від 1:337–1:336 до 1:200–1:196.

У таблиці 3.18, наведено дані стосовно установлення взаємозв'язку між загальною кількістю мікроорганізмів, кількістю мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* та бактеріями *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* під час транспортування збірного молока гатунку «екстра» та «вищий» за температури 8 °С.

Як бачимо з таблиці 3.18 під час транспортування збірного молока гатунків «екстра» та «вищий» за температури 8 °С спостерігається значне збільшення загальної кількості МАФАНМ, кількості мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* та бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*. Наприклад, у молоці гатунку «екстра» показник КМАФАНМ через 30–60 хв його транспортування становив на 4 тис. КУО/см³ ($p \leq 0,01$) при 12-годинному зберіганні на фермі та на 6 тис. КУО/см³ ($p \leq 0,01$) – при 24-годинному зберіганні на фермі більше. Відносна кількість мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* при цьому збільшилася на 2–3 %, а співвідношення кількості мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* до бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* збільшилося з 1:200–1:111 до 1:167–1:143 і до 1:111–1:100 відповідно.

Таблиця 3.18 – Встановлення взаємозв'язку між загальною кількістю мікроорганізмів, кількістю мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* та бактеріями *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) під час транспортування збірного молока охолодженим до 8 °С (М ± m, n = 143)

Гатунок	Кількість проб молока	Показник			
		КМАФАнМ, тис. КУО/см ³	мікроорганізми родини <i>Enterobacteriaceae</i> , тис. КУО/см ³ (%)	бактерії <i>Cronobacter spp.</i> (<i>E. sakazakii</i>), КУО/см ³ (%)	співвідношення <i>Enterobacteriaceae</i> / <i>Cronobacter spp.</i> (<i>E. sakazakii</i>)
Збірне молоко, охолоджене до 8 °С (після 12 годин зберігання на фермі), транспортування впродовж 25–30 хв					
«Екстра»	15	79 ± 9,9**	17,4 ± 1,3 (22 %)	104 ± 22,7 (0,6 %)	1:167
«Вищий»	17	263 ± 1,7*	65,8 ± 10,7 (25 %)	729 ± 32,5 (1,2 %)	1:83
Збірне молоко, охолоджене до 8 °С (після 12 годин зберігання на фермі), транспортування впродовж 30–60 хв					
«Екстра»	25	81 ± 10,2**	18,5 ± 1,0 (23 %)	130 ± 12,7* (0,7 %)	1:143
«Вищий»	26	278 ± 51,9**	68,5 ± 10,9 (25 %)	787 ± 42,4 (1,2 %)	1:83
Збірне молоко, охолоджене до 8 °С (після 24 годин зберігання на фермі), транспортування впродовж 25–30 хв					
«Екстра»	15	83 ± 12,8*	18,5 ± 3,1 (22 %)	168 ± 5,8** (0,9 %)	1:111
«Вищий»	15	287 ± 12,7*	78,6 ± 11,9 (27 %)	1257 ± 42,5 (1,6 %)	1:63
Збірне молоко, охолоджене до 8 °С (після 24 годин зберігання на фермі), транспортування впродовж 30–60 хв					
«Екстра»	15	90 ± 12,5*	22,5 ± 3,2 (25 %)	225 ± 17** (1 %)	1:100
«Вищий»	15	290 ± 31,4	83,2 ± 1,2 (29 %)	1298 ± 55,3 (1,5 %)	1:60

Примітка: в колонці 4 (%) – відносна кількість до КМАФАнМ, у колонці 5 (%) – відносна кількість до мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae*; * – p ≤ 0,05, ** – p ≤ 0,01 – щодо показників охолодженого молока, яке зберігалось на фермі, наведених у табл. 3.14

Під час транспортування збірного молока вищого гатунку за температури 8 °С загальна кількість МАФАНМ теж збільшилася в середньому на 11–35 тис. КУО/см³ через 25–30 хв транспортування та на 26–38 тис. КУО/см³ через 30–60 хв транспортування ($p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$). Відносна кількість мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* при цьому була в межах 25 та 27–29 %. Співвідношення бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) до кількості мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* становило від 1:83 до 1:63–1:60.

Отже, наприкінці цього підрозділу можна зазначити, що з підвищенням температури й тривалості зберігання збірного сирого молока корів збільшуються кількість МАФАНМ та кількість мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* і бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*).

Живильні середовища для виявлення бактерій *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter spp.*). Багато вчених займаються розробленням живильних середовищ для виявлення бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) [304, 309, 323, 357, 363, 366, 372, 413, 434]. Їх класифікація наведена в таблиці 3.19.

Таблиця 3.19 – Живильні середовища для виявлення бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*)

Назва середовища	Англійська назва середовища (скорочена назва або/та синоніми)	Метод, де застосовується середовище
1	2	3
Рідкі середовища для попереднього збагачення		
Буферно-пептонна вода	Buffered Peptone Water (BPW)	ISO 22964:2006 [383]
Рідкі селективні середовища збагачення		
Модифікований лаурил-сульфатний бульйон із ванкоміцином	Modified Lauryl Sulphate Broth with vancomycin (mLSB, Modified Lauryl sulfate with Vancomycine, vancomycin medium)	ISO 22964:2006 [383]

Продовження таблиці 3.19

1	2	3
Бульйон збагачення для бактерій родини <i>Enterobacteriaceae</i> за Масселем	<i>Enterobacteriaceae</i> Enrichmentbroth (<i>Enterobacteriaceae</i> enrichment broth Mosse (EEBroth, EEBrothMossel))	FDA-метод [300]
Селективний бульйон для <i>Enterobacter sakazakii</i>	<i>Enterobacter Sakazakii</i> Selective Broth (ESSB)	AES-метод [311]
Бульйон збагачення для <i>Enterobacter sakazakii</i>	<i>Enterobacter Sakazakii</i> Enrichment Broth(ESE Broth)	DFI-метод [304]
<i>Cronobacter</i> -бульйон	<i>Cronobacter</i> Broth	Appl Environ Microbiol. (2008) 74:2550-3
<i>Cronobacter</i> -скринінг-бульйон	<i>Cronobacter</i> Screening Broth(CBS)	Screening–метод Appl Environ Microbiol. (2008) 74:2550-3
Щільні селективні середовища для попереднього виділення		
Глюкозо-жовчний агар з кристалічним фіолетовим та нейтральним червоним	Violet Red Bile Glucose Agar (VRGB agar, VRBGA)	FDA-метод [300]
Щільні диференціальні середовища		
Хромогенні агари:		
Агар для виділення <i>Enterobacter sakazakii</i>	<i>Enterobacter sakazakii</i> Isolation Agar (ESIA chromogenic Agar, ESIA)	ISO 22964:2006 [383], AES-метод [311]
Хромогенний агар для <i>Enterobacter sakazakii</i> ESSP	<i>E. sakazakii</i> creeningplate (ESSP) виробництва R&FProductsInc.	ISO 22964:2006 [383] FDA-метод [300]
Хромогенний агар для <i>Enterobacter sakazakii</i> DFI	<i>Enterobacter sakazakii</i> chromogenic agar (Druggan-Forsythe-Iversen (DFI) formulationagar, DFIfagar, DFIA)	DFI-метод [304]

Продовження таблиці 3.19

1	2	3
Модифікований DFI-агар	modified Druggan-Forsythe-Iversen (mDFI) Agar	DFI-метод [304, 311]
Хромогенний агар для <i>Enterobacter sakazakii</i> CES	Cromocult <i>Enterobacter sakazakii</i> agar (CESagar, CES) виробництва Merck, Германія (100873.0100, 100873.0500)	ISO 22964:2006 [383] FDA-метод [300]
Хромогенний агар для <i>Enterobacter sakazakii</i> ESPM	<i>E. sakazakii</i> plating medium (ESPM або EsPM) виробництва R&F Products Inc.	ISO 22964:2006 [383, 434]
Хромогенний агар для виділення <i>Cronobacter</i>	Chromogenic <i>Cronobacter</i> Isolation Agar (CCI) (CM1122B) виробництва Oxoid Ltd., UK	
Флюорогенні агари:		
<i>E. sakazakii</i> середовище (OK-агар)	<i>E. sakazakii</i> Medium(Oh&Kang (OK) Agar)	[413]
<i>LB-агар</i>	Leuschner-Bew Agar	[366]
Середовище для підтвердження продукування жовтого пігменту		
Триптон-соевий агар	Tryptone Soya agar (TSA)	ISO 22964:2006 [383], FDA-метод [300]
Тест-система для підтвердження біохімічних властивостей		
API 20E-система для біохімічної ідентифікації <i>Enterobacteriaceae</i> та інших грам-негативних паличок	API 20E, ID 32E strip	ISO 22964:2006 [383], FDA-метод [300], DFI-метод [304]

Рідкі середовища для попереднього збагачення

Буферно-пептонна вода – це середовище, що найчастіше використовується для попереднього збагачення при виявленні більшості видів мікроорганізмів із продуктів та об'єктів довкілля. Крім того, його можна використовувати як розчинник при десятикратних розведеннях досліджуваних проб.

Попереднє збагачення в буферно-пептонній воді за температури 35 °C упродовж 18–24 годин сприяє відновленню пошкоджених та ослаблених мікробних клітин. Готове середовище світло-жовтого кольору і прозоре, за наявності росту воно стає мутним, на поверхні може з'явитися поверхнева плівка, на дні пробірки – осад. Після культивування на буферно-пептонній воді проводять пересівання на селективні середовища (рідкі або густі).

Рідкі селективні середовища збагачення

Модифікований лаурил-сульфатний бульйон із ванкоміцином використовують як рідке середовище для селективного збагачення у разі виявлення бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) у молоці та молочних продуктах згідно з ISOTS/22964:2006 (детально метод описано нижче в цьому розділі). Вперше метод із застосуванням цього середовища описаний Guillaume-Gentil та ін. у 2005 році. Основою середовища є лаурил-сульфатний триптозний бульйон, до якого додають 10 мг/л (10 мкг/см³) антибіотика ванкоміцину. Підвищений вміст у середовищі солі (NaCl кількістю 34 г/л) призупиняє ріст більшості представників роду *Enterobacteriaceae*, а комбінація ванкоміцину та лаурил-сульфату інгібує ріст супутніх грам-позитивних мікроорганізмів.

Перед застосуванням модифікованого лаурил-сульфатного бульйону з ванкоміцином згідно з ISOTS/22964:2006 необхідне попереднє збагачення в буферно-пептонній воді. Культивування попередньо збагачених культур у модифікованому лаурил-сульфатному бульйоні з ванкоміцином проводять за температури (45 ± 0,5) °C впродовж (22 ± 2) години. Нижче в таблиці 3.20 наведено ріст тест-культур на модифікованому лаурил сульфатному бульйоні з ванкоміцином.

Таблиця 3.20 – Ріст тест-культур на модифікованому лаурил-сульфатному бульйоні з ванкоміцином

Вид мікроорганізмів	Ріст на середовищі
Позитивний контроль	
<i>Cronobacter sakazakii</i>	Помутніння бульйону
<i>Cronobacter muytjensii</i>	Помутніння бульйону
Негативний контроль	
<i>Escherichia coli</i>	Інгібується, росту не відзначено
<i>Staphylococcus aureus</i>	Інгібується, росту не відзначено

Отже, підвищений вміст солі в середовищі, з одного боку, та додавання антибіотика, з іншого – в поєднанні з високою температурою культивування є оптимальними умовами для росту, розвитку бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) і виявляють пригнічувальну дію на супутню мікрофлору.

Бульйон збагачення для бактерій родини *Enterobacteriaceae* за Масселем використовують для виділення та моніторингу санітарного стану харчових продуктів стосовно ентеробактерій. Основою середовища є брильянтово-зелений бульйон, в якому лактоза замінена на глюкозу, що сприяє росту більшості видів ентеробактерій. До складу середовища входять пептони, що є джерелом азоту, вітамінів та амінокислот. Брильянтовий зелений та препарат жовчі – селективні агенти, які інгібують грам-позитивні мікроорганізми.

Після приготування середовища відповідно до порад виробника воно стає зеленуватого кольору, прозоре, а після внесення досліджуваного матеріалу та інкубування змінюється колір середовища від світло-жовтого, зеленувато-жовтого до жовтого, з'являються помутніння, осад та поверхнева плівка, що свідчить про характерний ріст представників родини *Enterobacteriaceae* (позитивна реакція). Якщо колір середовища після інкубування не змінився – негативна реакція (рис. 3.15–3.17).

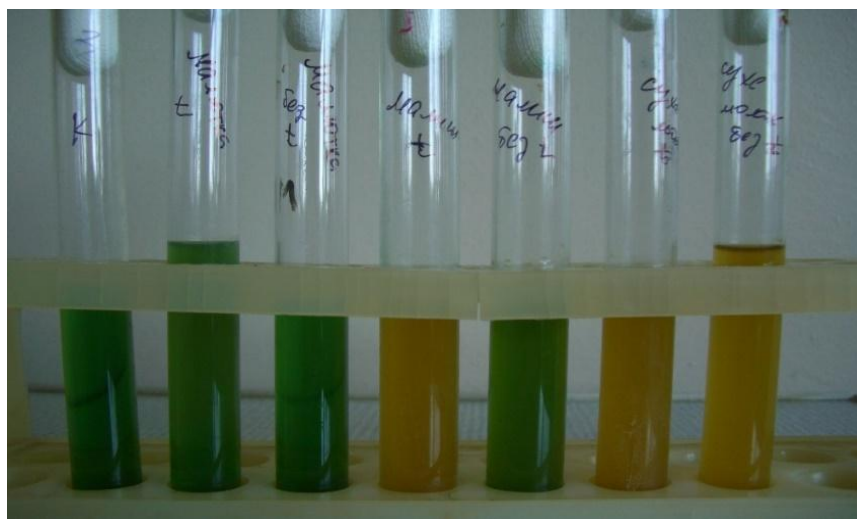


Рисунок 3.15 – Ріст на бульйоні збагачення для бактерій родини *Enterobacteriaceae* за Масселем (пробірки: 1 – контроль; 2, 3 – негативна реакція (відсутність росту); 4, 6, 7 – позитивна реакція (наявність росту); 5 – слабовиражений ріст)



Рисунок 3.16 – Характерний ріст представників родини *Enterobacteriaceae* на бульйоні збагачення для бактерій родини *Enterobacteriaceae* за Масселем (1,2 пробірки – відзначено ріст; 3 – пробірка – контроль)

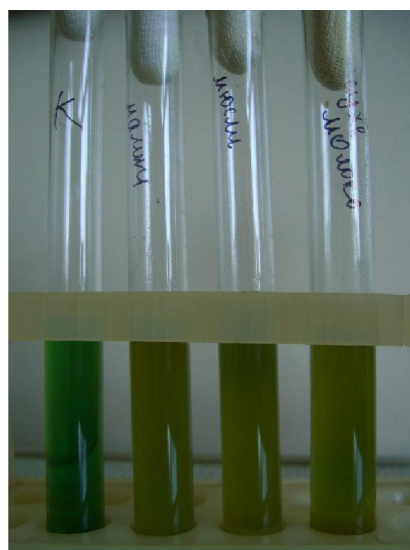


Рисунок 3.17 – Слабовиражений ріст на бульйоні збагачення для бактерій родини *Enterobacteriaceae* за Масселем (1 пробірка – контроль; 2 – 4 – пробірки, відзначений слабкий ріст (колір середовища світлого зеленувато-жовтого кольору))

Для проведення дослідження рекомендують 1 об'єм досліджуваного матеріалу вносити в 9 об'ємів збагачуваного бульйону для отримання розведення 1:10, інкубувати за температури 30–35 °С (до 37 °С) упродовж 24–48 годин. Рекомендується після перших трьох годин культивування на збагачуваному бульйоні культуру ретельно перемішати або струсити. Після інкубування відзначають характерний ріст на бульйоні збагачення для бактерій родини *Enterobacteriaceae* за Масселем.

У подальшому для попереднього виявлення та підрахунку кількості мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* культуру з пробірок, в яких відзначено характерний або слабовиражений ріст, пересівають на глюкозо-жовчний агар із кристалічним фіолетовим та нейтральним червоним у чашці Петрі. Після інкубування на агарі (35–37 °С 18–24 годин) перевіряють посіви з метою виявлення та підрахунку кількості типових для ентеробактерій колоній: від світло-рожевих до темно-червоних. Для підтвердження виду мікроорганізмів необхідно провести ще морфологічні, культуральні та біохімічні дослідження.

Нижче в таблиці 3.21 наведено ріст тест-культур на бульйоні збагачення для бактерій родини *Enterobacteriaceae* за Масселем.

Таблиця 3.21 – Ріст тест-культур на бульйоні збагачення для бактерій родини *Enterobacteriaceae* за Масселем

Вид мікроорганізмів	Ріст на середовищі	Колір середовища при рості мікроорганізмів
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Добрий	Жовтий
<i>E.coli</i>	Добрий	Жовтий
<i>Salmonella enteritidis</i> <i>Salmonella typhimurium</i>	Добрий	Слабо-жовтий
<i>Staphylococcus aureus</i>	Інгібується	Колір середовища не змінюється (зелений)
<i>Bacillus cereus</i>	Інгібується	Колір середовища не змінюється (зелений)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Добре	Колір середовища не змінюється (мутно-зеленуватий)

Cronobacter-скринінг-бульйон – це нове живильне середовище для виявлення *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* із продуктів харчування та об'єктів довкілля виробництва Oxoid (UK), що використовується поряд із хромогенним агаром.

Cronobacter-скринінг-бульйон був спеціально розроблений С. Iversen та ін. [309]. До складу середовища входять такі компоненти: пептон, м'ясний екстракт, NaCl, бром-крезол пурпурний, сахароза та гідрохлорид ванкоміцину. Оптимальна температура для культивування на цьому середовищі – 42 °С впродовж 24 годин. Готове середовище пурпурового кольору, поява після культивування жовтого або помаранчевого кольору середовища свідчить про попередню наявність бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*. Якщо після культивування колір середовища не змінився, то досліджувані зразки є негативними щодо наявності в них бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*.

Нижче в таблиці 3.22 наведено ріст тест-культур на *Cronobacter-скринінг-бульйоні*.

Таблиця 3.22 – Ріст тест-культур на *Cronobacter-скринінг-бульйоні*

Вид мікроорганізму	Ріст на середовищі
Позитивний контроль	
<i>Cronobacter sakazakii</i>	Помутніння бульйону, жовтий або помаранчевий колір бульйону
<i>Cronobacter muytjensii</i>	Помутніння бульйону, жовтий або помаранчевий колір бульйону
Негативний контроль	
<i>Escherichia coli</i>	Помутніння бульйону, пурпурний колір бульйону
<i>Staphylococcus aureus</i>	Інгібується, росту не відзначено

Густі селективні середовища для попереднього виділення

Після попереднього збагачення та збагачення на рідкому живильному середовищі проводять посів на густі селективні середовища для попереднього виділення бактерій родини *Enterobacteriaceae*. Одним із таких середовищ є глюкозо-жовчний агар із кристалічним фіолетовим та нейтральним червоним,

яке найбільш часто використовують не лише для виявлення, а й для підрахунку бактерій родини *Enterobacteriaceae*, зокрема й *E. sakazakii* у воді та різних харчових продуктах [300, 381, 382]. Кристалічний фіолетовий та солі жовчі як основні компоненти середовища інгібують ріст грам-позитивних мікроорганізмів.

Існує кілька методів посіву на глюкозо-жовчний агар із кристалічним фіолетовим та нейтральним червоним:

метод I: по поверхні агару за допомогою стерильного шпателя розподіляють 0,1 см³ збагаченої культури для отримання поодиноких колоній;

метод II: по поверхні агару за допомогою бактеріологічної петлі (Ø 3 мм, 10 мкл) проводять посів збагаченої культури штрихом для отримання поодиноких колоній;

метод III: 1 см³ збагаченої культури вносять у пусту стерильну чашку Петрі, зверху наливають 12–15 см³ рідкого охолодженого до 45 °С агару та добре перемішують і на поверхню його знову наливають тонкий шар агару (2 мм).

Чашки Петрі з посівами витримують у термостаті за температури (36 ± 1) °С впродовж (24 ± 2) години. Бактерії родини *Enterobacteriaceae* на глюкозо-жовчному агарі з кристалічним фіолетовим та нейтральним червоним ростуть у вигляді колоній від світло-рожевого до темно-червоного кольору, інколи із зоною преципітації навколо них. Нижче в таблиці 3.23 наведено ріст тест-культур на глюкозо-жовчному агарі з кристалічним фіолетовим та нейтральним червоним.

Таблиця 3.23 – Ріст тест-культур на глюкозо-жовчному агарі з кристалічним фіолетовим та нейтральним червоним

Вид мікроорганізму	Ріст на середовищі
Позитивний контроль	
<i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i>	Гарний ріст, пурпурові (фіолетові)/рожеві колонії з ареолом навколо них
Негативний контроль	
<i>Enterococcus faecalis</i>	Не росте

Щільні диференціальні середовища. Н. L. Muytjens та J. van der Ros-van de Rere (1984) описали ферментні характеристики бактерії *E. sakazakii* та подібних видів мікроорганізмів з особливим акцентом на α -глюкозидазну активність [396]. J. J. Farmer та B. R. Davis (1985) виявили 53 із 57 штамів *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*, які були позитивними щодо α -глюкозидазної активності. На сьогодні встановлення глюकोзидазної активності у виділених штаммах чи культурах є основним у використанні під час розроблення диференціальних середовищ для бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* [311, 366, 413, 434].

Щільні диференціальні середовища для виявлення бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* поділяють на хромогенні та флюорогенні (табл. 3.15).

За основний субстрат, що входить до складу хромогенних середовищ для виявлення бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*, використовують 5-bromo-4-chloro-3-indoxyl-alpha-D-glucopyranoside (X α Glc), який є селективним маркером для виявлення ферменту α -глюкозидази, що виділяється бактеріями *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*, в результаті цього утворюються колонії зеленувато-синього кольору. Інші мікроорганізми не мають цього ферменту, що розщеплює основну речовину живильного середовища, тому їх колонії інших кольорів.

До складу агару для виділення *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* (*Enterobacter sakazakii* Isolation Agar (ESIA)), крім основного субстрату (5-bromo-4-chloro-3-indoxyl-alpha-D-glucopyranoside), входить кристалічний фіолетовий, що інгібує супутні грам-позитивні мікроорганізми та інші речовини.

Застосування цього середовища передбачене ISO 22964:2006. Послідовність проведення досліджень згідно з ISO 22964:2006 наведена нижче в даному розділі. На цьому середовищі бактерії *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* утворюють колонії зеленувато-синього або синього кольору за умови культивування посівів упродовж (24 ± 2) години за температури (44 ± 1) °C.

Можливий ріст та описання колоній інших видів мікроорганізмів на ESIA наведено в таблиці 3.24.

Таблиця 3.24 – Ріст тест-культур на *Enterobacter sakazakii* Isolation Agar (ESIA)

Вид мікроорганізмів	Ріст мікроорганізмів на середовищах
<i>Cronobacter spp. (E. sakazakii)</i>	Колонії зеленувато-синього або синього кольору
<i>E. coli</i>	Колонії червоно-фіолетового кольору
<i>Staphylococcus spp.</i>	Ріст відсутній

Enterobacter sakazakii хромогенний агар (Druggan–Forsythe–Iversen (DFI) formulationagar, DFIfagar) виробництва Oxoid Ltd., UK або *Brilliance™ Enterobacter sakazakii* Agar, був розроблений Druggan, Forsythe та Iversen, як перше живильне середовище, основою якого є 5-bromo-4-chloro-3-indoxyl-alpha-D-glucopyranoside. Крім основної речовини, до складу живильного середовища входить дезоксихолат, що інгібує супутні грам-позитивні мікроорганізми.

За рекомендаціями розробників середовища, його можна використовувати при постановці FDA-методу (детальний опис проведення дослідження згідно з цим методом наведено нижче в даному розділі). При цьому дослідні проби інкубують у дистильованій воді (36 ± 1) °C впродовж (18 ± 2) години, потім збагачують у бульйоні для бактерій родини *Enterobacteriaceae* (EE Broth Oxoid Ltd., (CM0317) за температури (36 ± 1) °C впродовж (18 ± 2) години, далі проводять пересівання на DFI-агар і культивують за температури (36 ± 1) °C впродовж 24 годин. На цьому середовищі бактерії *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* утворюють колонії синьо-зеленого кольору.

Можливий ріст та описання колоній інших видів мікроорганізмів на хромогенному агарі наведено в таблиці 3.25.

Таблиця 3.25 – Ріст тест-культур на хромогенному агарі DFI

Вид мікроорганізму	Ріст мікроорганізмів на середовищах
<i>Cronobacter spp. (E. sakazakii)</i>	Колонії синьо-зеленого кольору
<i>E. coli</i>	Колонії солом'яного кольору
<i>Staphylococcus spp.</i>	Ріст відсутній

Хромогенний агар для *Enterobacter sakazakii* (Cromocult *Enterobacter sakazakii* agar (CESagar, CES) виробництва Merck, Германія. До складу середовища входять основні речовини: глюкоза та солі жовчі як інгібітори супутньої мікрофлори. Крім того, інгібуючим фактором для більшості грам-позитивних та грам-негативних супутніх мікроорганізмів є температура культивування посівів, яка повинна становити не більше ніж $(44 \pm 1) ^\circ\text{C}$. Культивування на цьому середовищі за визначеної температури становить (24 ± 2) години, і бактерії *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* утворюють колонії бірюзового кольору (темно-зеленувато-сині).

Можливий ріст та описання колоній інших видів мікроорганізмів на хромогенному агарі наведено таблиці 3.26.

Таблиця 3.26 – Ріст тест-культур на хромогенному агарі CES

Вид мікроорганізму	Ріст мікроорганізмів на середовищах
<i>Enterobacter sakazakii (Cronobacter spp.)</i>	Колонії темно-зеленувато-синього кольору (бірюзового кольору)
<i>Enterobacter cloacae</i>	Колонії білого кольору
<i>E. coli</i>	Колонії білого кольору
<i>Proteus mirabilis</i>	Колонії білого кольору
<i>Enterococcus faecalis</i>	Ріст відсутній
<i>Staphylococcus spp</i>	Ріст відсутній

Австрійськими вченими М. Manafi та К. Lang (2007) з Інституту гігієни Віденського медичного університету були проведені детальні дослідження

стосовно росту різних видів мікроорганізмів і, зокрема, бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* на цих трьох хромогенних агарах за різних температурних режимів культивування [372]. Результати їх досліджень наведені в таблиці 3.27.

Таблиця 3.27 – Вплив температури культивування на ріст та колір колоній різних видів мікроорганізмів на хромогенних агарах для виявлення бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* [372]

Вид мікроорганізму	ESIA		DFI agar		CES agar	
	37 °C	45 °C	37 °C	45 °C	37 °C	45 °C
1	2		3		4	
<i>Cronobacter spp. (E. sakazakii)</i>	Колонії зеленувато-синього кольору		Колонії зеленого кольору		Колонії бірюзового (темно-зеленувато-синього) кольору	
<i>B. cereus, B. subtilis, E. faecalis, S. aureus</i>	Ріст не відзначено					
<i>P. vulgaris</i>	Колонії жовтого кольору		Колонії коричневого кольору		Колонії світло-зеленого кольору	Колонії білого кольору
<i>P. mirabilis</i>	Колонії лілового кольору	Колонії жовтого кольору	Колонії коричневого кольору		Колонії білого кольору	
<i>E. coli, E. cloacae</i>	Колонії лілового кольору		Колонії кольору охри		Колонії білого кольору	
<i>S. saprophyticus</i>	Ріст не відзначено				Колонії бірюзового кольору	Ріст не відзначено
<i>K. pneumoniae</i>	Колонії синього кольору	Колонії лілового кольору	Колонії зелено-го кольору	Колонії кольору охри з центром зеленого кольору	Колонії білого кольору	
<i>P. aeruginosa, P. fluorescens, P. putida</i>	Колонії жовтого кольору		Колонії коричневого кольору		Колонії жовтого кольору	
<i>E. cloacae</i>	Колонії світло-зеленого кольору	Ріст не відзначено	Колонії кольору охри		Колонії білого кольору	

Продовження таблиці 3.27

1	2		3	4
<i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. cholerae</i>	Колонії кольору охри		Ріст не відзначено	Ріст не відзначено
<i>P. shigelloides</i>	Колонії синього кольору	Колонії лілового кольору	Колонії зеленого кольору	Колонії кольору охри

Як бачимо з наведеної таблиці 3.27, бактерії *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) утворюють колонії світло-зеленувато-синього кольору на агарі ESIA, бірюзові (темно-зеленувато-синього кольору) на агарі CES і колонії зеленого кольору на DFI, як за температури 37, так і 45 °С. Важливим моментом є те, що мікроорганізми виду *S. saprophyticus* на CES agar (37 °С), теж утворювали колонії бірюзового кольору, а мікроорганізми виду *K. pneumoniae* – колонії зеленого кольору на DFI-середовищі (37 °С), що є подібним для росту бактерії *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*). Проте за високих температур культивування посівів (45 °С) ці ознаки двох вищезгаданих видів мікроорганізмів зникали на відміну від бактерій *E. sakazakii*. Інші види бактерій утворювали відмінні за кольором колонії за різних температур.

Важливими характеристиками живильних середовищ є їх чутливість та специфічність.

Чутливість живильних середовищ визначають як кількість правдивих позитивних (ПП) результатів, поділених на суму правдивих позитивних (ПП) та неправдивих негативних (НН) результатів і виражених у процентах:

$$\text{Чутливість} = \text{ПП} / (\text{ПП} + \text{НН}) \times 100 \%$$

Специфічність живильних середовищ визначають як кількість правдивих негативних (ПН) результатів, поділених на суму правдивих негативних (ПН) та неправдивих позитивних (НП) результатів і виражених у процентах:

$$\text{Специфічність} = \text{ПН} / (\text{ПН} + \text{НП}) \times 100 \%$$

Стандартні результати та результати тестування живильних середовищ наведені в таблиці 3.28.

Таблиця 3.28 – Стандартні результати та результати тестування живильних середовищ

Показник		Стандарт	
		позитивний результат	негативний результат
Тестування середовища	Позитивний результат	Правдивий позитивний (ПП)	Неправдивий позитивний (НП)
	Негативний результат	Неправдивий негативний (НН)	Правдивий негативний (ПН)

Таблиця 3.29 – Чутливість та специфічність хромогенних агарів для виявлення бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* за різних температурних режимів культивування [372]

Показник		37 °C	45 °C
ESIA	Чутливість	100 %	100 %
	Специфічність	92 %	97 %
DFI agar	Чутливість	100 %	93 %
	Специфічність	95 %	98 %
CESagar	Чутливість	100 %	100 %
	Специфічність	95 %	100 %

Отже, за результатами автори зробили висновок про те, що ці три хромогенні середовища дійсно можна використовувати як диференціальні стосовно виявлення бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*. Але основною умовою є підвищена температура культивування посівів, оскільки вона сприятлива для росту й розвитку термофільних бактерій, якими вважають бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*, а також підвищена температура інгібуюче діє на інші види супутньої мікрофлори [372].

E. sakazakii plating medium (ESPM) виробництва R&F Laboratories, США – це середовище розроблене та запропоноване L. Restaino, E. W. Frampton, W. C. Lionberg, R. J. Becker (2006), як хромогенний агар виявлення бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* у харчових продуктах та об'єктах довкілля. До складу середовища входять два хромогенні субстрати (5-bromo-4-chloro-3-indoxyl-alpha-D-glucopyranoside та 5-bromo-4-chloro-3-indoxyl-beta-D-cellobioside), три вуглеводи (сорбітол, D-арабітол та адонітол), рН-індикатор та інгібітори (солі жовчі та антибіотики – ванкоміцин і цефсулодин). Середовище є готовим для використання й розлите в чашки Петрі [434].

Для отримання росту на середовищі ESPM посіви необхідно культивувати за температури 35–37 °C або 41,5 °C впродовж 24 годин. Бактерії *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* ростуть у вигляді колоній діаметром 1–2 мм від синьо-чорного до синьо-сірого кольору. У разі появи зелених та жовтих колоній зелені колонії повинні теж вважатися як типові і перевіряти їх потрібно шляхом повторного посіву та культивування на середовищі ESPM до появи типових синьо-чорних або синьо-сірих колоній.

За рекомендаціями розробників цей агар можна застосовувати як диференціальне середовище для виявлення колоній, підозрілих на бактерії *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*, під час проведення досліджень згідно з ISO/TS22964:2006 або FDA-методом після попереднього збагачення в буферно-пептонній (BPW) воді та модифікованому лаурил-сульфатному бульйоні з ванкоміцином (mLSTbroth + vancomycin). Підтвердження ідентифікації бактерії *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* проводять за біохімічними властивостями за допомогою ID 32E-тесту.

Флюорогенні диференціальні середовища своєю основою містять 4-Methylumbelliferyl- α -D-glucoside (MU α Glc), який є флюорогенним субстратом або селективним маркером для виявлення ферменту α -глюкозидази, що виділяється бактеріями *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* і чітко відрізняє їх від інших бактерій [413]. При продукуванні бактеріями ферменту α -глюкозидази відбувається розщеплення 4-Methylumbelliferyl- α -D-glucoside з вивільненням

4-Methylumbelliferyl і при перегляді посівів із використанням ультрафіолетового опромінення (довжина хвиль – 366) відзначають яскраве флюоресціувальне світіння колоній бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* на цих середовищах.

ОК-агар (Oh&Kang (OK) Agar) розроблено S. W. Oh та D. H. Kang (2004) для покращання методів виявлення саме цих бактерій. Крім основної складової (4-Methylumbelliferyl- α -D-glucoside), до середовища входять триптон, який є джерелом азоту, вітамінів та амінокислот для мікроорганізмів, солі жовчі, що пригнічують ріст та розвиток грам-позитивних мікроорганізмів, тіосульфат натрію та амонію цитрат заліза як додаткові маркери для диференціації продукування H₂S [413].

Послідовність досліджень із використанням флюорогенного середовища передбачає попереднє збагачення в бульйоні для бактерій родини *Enterobacteriaceae*за Масселем (інкубування за температури (37 ± 2) °С впродовж 20–24 годин) із подальшим пересіванням на вищезгадане диференціальне середовище (інкубування за температури (37 ± 2) °С впродовж 24 годин). Після інкубування посівів на флюорогенному середовищі, характерними для *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* будуть колонії середнього розміру з флюоресценцією в променях ультрафіолетового опромінення.

Середовище для підтвердження продукування жовтого пігменту. Основною диференціальною ознакою для бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* є продукування жовтого пігменту, тобто утворення на живильному середовищі колоній жовтого кольору. Для цього використовують триптон-соевий агар, на якому проводять тривале культивування культур упродовж (48 ± 2) години (інколи до 72 годин) за температури 25 °С. Лише за цих умов можливе утворення колоній із жовтим пігментом бактеріями *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* [10, 15, 52–55, 95, 381, 382].

Але є відомості про існування інших видів бактерій із родини *Enterobacteriaceae*, які можуть виділятися з клінічного матеріалу та води й утворювати жовтий пігмент на триптон-соевому агарі [413]. Тому для чіткої

типізації мікроорганізмів та становлення їх виду необхідно проводити біохімічну ідентифікацію.

Методи виявлення, визначення кількості та типізація *Enterobacter sakazakii*

Виділення бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* передбачає проведення таких етапів:

- ✓ попереднє збагачення (для «пробудження», відновлення ослаблених бактеріальних клітин);
- ✓ збагачення (для збільшення кількості бактеріальних клітин);
- ✓ виділення (попередня ідентифікація мікроорганізму на густих живильних середовищах);
- ✓ ідентифікація (біохімічне підтвердження попередньо виділеного мікроорганізму);
- ✓ підтвердження (серологічними або молекулярними методами).

На сьогодні існують мікробіологічні методи виявлення та визначення кількості *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* і методи молекулярно-генетичного аналізу (виділення й типізації), або ДНК-методи (табл. 3.30).

Таблиця 3.30 – Методи виявлення, визначення кількості й типізації бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*

Мікробіологічні методи		ДНК-методи	
1	2	3	4
виявлення	визначення кількості	виявлення	типізації
<ul style="list-style-type: none"> • ISO/IDF стандартний метод виявлення <i>E. sakazakii</i> [ISO/TS 2964:2006(E)] 	метод визначення НВЧ згідно з ISO 21528-1; FDA-метод [FDA (2002)]; метод підрахунку колоній згідно з ISO 21528-2	BAX-ПЛП (BAX-PCR) [The DuPont Qualicon. <i>Bax</i>] Real-time PCR [Derzelle S., Dilasser F., Heuvelink et al., 2004; Liuetal., 2006]	Pulsed-fieldgel electrophoresis (PFGE) [M. Nazarowec-White, J. M. Farber, 1999 i N. R Mullane, P. Whyte, P. G. Wall, T. Quinn, 2007] Plasmid-Typisierung, Clark et al., 1990

Продовження таблиці 3.30

1	2	3	4
		-ompA-targeted PCR Venkitanarayanan (2006)	Ribotypisierung, Iversen et al., 2007
			AFLP (Amplified fragment length polymorphisms), Iversen et al., 2007
			DNA-DNA Hybridisierung, Iversen et al., 2007
			Gensequenzierung, Iversen et al., 2007
			Random amplification of polymorphic DNA (RAPD-PCR) [Nazarowec-White und Farber, 1999 Clementino M. M., De Filippis I., Nascimento C. R., 2001]
			Ribotyping [Bruce J. Automated, 1996]

Мікробіологічні методи виявлення та визначення кількості *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* передбачають виконання таких етапів: попереднє збагачення, збагачення в рідкому селективному середовищі з подальшим пересіванням на поверхню густих селективних середовищ із метою виявлення типових для *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* колоній та остаточним підтвердженням за біохімічними властивостями [52–55, 95]. Ці методи є досить довготривалими – більше ніж 5–7 діб.

ДНК-методи є більш швидкими і точними на відміну від мікробіологічних методів, оскільки дозволяють виявити збудника, наявного в досліджуваних пробах у малих кількостях та в асоціаціях з іншими мікроорганізмами.

Мікробіологічні методи виявлення та визначення кількості

Cronobacter spp. (E. sakazakii)

Методи виділення та підрахунку кількості бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*. У цьому підрозділі наведено основні дані про живильні середовища, що використовуються для культивування бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*, описано методи виділення та підрахунку кількості цих мікроорганізмів згідно з європейськими стандартами:

- Commission Regulation (EC) 2073/2005 of 15.11.2005 on microbiological criteria for foodstuff (Регламент Комісії ЄС 2073/2005 «Мікробіологічні критерії для харчових продуктів») [379];

- ISO/TS 22964:2006(E) IDF/RM 210:2006 (E) Milk and milk products – Detection of *Enterobacter sakazakii* (ISO/TS 22964:2006 IDF/RM 210:2006 (E) Молоко та молочні продукти. Виділення *Enterobacter sakazakii* [383];

- Method of Isolation and Enumeration of *Enterobacter sakazakii* from Dehydrated Powdered Infant Formula (U. S. Food and Drug Administration – FDA-Method) (Метод виділення та підрахунку *Enterobacter sakazakii* в сухих продуктах для дитячого харчування – FDA-метод) [300].

Методи виділення бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* базуються на посіві певної кількості продукту на рідкі збагачувальні середовища з подальшим пересіванням на поверхню густих селективних середовищ з метою виділення типових для бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* колоній та остаточним підтвердженням цих мікроорганізмів за біохімічними властивостями. Об'єктами дослідження на наявність бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* є сире молоко, інгредієнти дитячих молочних сумішей, оточуюче середовище переробного підприємства та сухі молочні продукти для дітей раннього віку.

На сьогодні у світовій практиці існують один стандартний (еталонний) – метод виділення *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* згідно з ISO/TS 22964:2006(E) IDF/RM 210:2006(E) і три методи визначення кількості цих мікроорганізмів: європейський, канадський та FDA-метод, що базуються на встановленні

найбільш вірогідне число (НВЧ) бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* в досліджуваних пробах. Крім того, існує метод підрахунку кількості колоній [95, 300, 361, 379, 383].

Виділення *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* згідно з ISO/TS 22964:2006 (E) IDF/RM 210:2006 (E). Метод передбачає виявлення мікроорганізму шляхом попереднього збагачення досліджуваного матеріалу в буферно-пептонній воді з подальшим збагаченням у селективному модифікованому ванкоміциновому середовищі, виділення типових колоній *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* на хромогенному агарі, які при пересіванні на триптон-соєвий агар здатні утворювати жовтий пігмент, та з остаточним підтвердженням характерних біохімічних властивостей (рис. 3.18) [383].

Європейський метод є одним із перших методів визначення кількості бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*, що описаний у 1988 Н. L. Muytjens та співавторами [397]. Суть методу: три наважки досліджуваного матеріалу по 100 г, три наважки по 10 г та три наважки по 1 г розчиняють в 9-кратних об'ємах буферно-пептонної води (вихідне розведення 1:10) з подальшими пересівами на збагачувальний бульйон для бактерій родини *Enterobacteriaceae* та на поверхню густих селективних середовищ із метою виявлення типових для *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* колоній та остаточним підтвердженням за біохімічними властивостями (рис. 3.20) [95, 397, 451].

Канадський метод визначення кількості бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* запропонований у 1997 М. Nazarowec-White and J. M. Farber [401, 402]. Цей метод містить незначні зміни щодо європейського методу: наважки досліджуваного матеріалу (див. вище) розчиняють у стерильній воді, потім пересівають на збагачувальний бульйон для бактерій родини *Enterobacteriaceae*, на глюкозо-жовчний агар із кристалічним фіолетовим та нейтральним червоним, після цього пересівають на триптон-соєвий агар із 0,6 % дріжджового екстракту з подальшою біохімічною ідентифікацією (рис. 3.21) [95, 401, 402].

FDA-метод запропонований у 2002 і містить певні відмінності порівняно з канадським методом. Наважки досліджуваного матеріалу (див. європейський метод) розчиняють у стерильній дистильованій воді з подальшим збагаченням у бульйоні для бактерій родини *Enterobacteriaceae*, отримані на глюкозо-жовчному агарі з кристалічним фіолетовим та нейтральним червоним; підозрілі щодо *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* колонії пересівають на триптон-соевий агар. Потім відбирають колонії, що утворили жовтий пігмент, для підтвердження біохімічних властивостей за допомогою системи API 20E (рис. 3.19) [95, 300, 451].

Метод виділення *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* згідно з ISO/TS 22964:2006 (E) IDF/RM 210:2006 (E). Метод базується на виявленні мікроорганізмів, які утворюють типові зелені або зеленувато-блакитні дрібні колонії на хромогенному агарі для виділення *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* та колонії з жовтим пігментом на триптон-соевому агарі і проявляють характерні біохімічні властивості (рис. 3.18).

Для проведення дослідження використовують готові або сухі готові комерційні середовища, приготування яких проводять відповідно до інструкції на етикетці або рекомендацій фірми-виробника, після цього обов'язково перевіряють рН, яке необхідно встановлювати за температури 25 °С, а його коригування здійснюють за необхідності шляхом додавання соляної кислоти ($\text{HCl} = 1 \text{ моль/дм}^3$) або натрію гідроксиду ($\text{NaOH} = 1 \text{ моль/дм}^3$).

Якщо приготовлене живильне середовище та реактиви не використовують відразу, їх потрібно зберігати в темряві за температури 0 °С до +5 °С не довше 1 місяця або відповідно до настанов (інструкцій) виробника в умовах, що не допускають будь-яких змін в їх складі. Нижче в таблиці 3.31 наведено комерційні середовища, які застосовують згідно з цим методом.

Таблиця 3.31 – Комерційні середовища, які застосовують згідно з ISO/TS 22964:2006 (E) IDF/RM 210:2006 (E)

Назва середовища	Каталожний номер та фірма-виробник/дистриб'ютор
Буферно-пептонна вода (суха) (Buffered Peptone Water, BPW)	M 614, HiMedia; 1.07228.0500, Merck; CM 0509, Oxoid
Лаурил-сульфатний бульйон (Lauryl Sulphate Broth, LSB)	M 080, HiMedia; 1.10266.0500, Merck; CM0451, Oxoid
Модифікований лаурил-сульфат-триптоновий (триптозний) бульйон із ванкоміцином (Modified lauryl sulfate tryptose broth (with vancomycin), mLST)	CM1133, Oxoid
Агар для виділення <i>Enterobacter sakazakii</i> (<i>Enterobacter sakazakii</i> Isolation Agar, ESIA)	CM1134, Oxoid; 100873.0100, Merck; 100873.0500, Merck
Триптон-соевий агар (Tryptone Soyaagar)	M290, HiMedia; CM0131, Oxoid
API 20E-система для біохімічної ідентифікації <i>Enterobacteriaceae</i> та інших грам-негативних паличок	20100, «BioMérieux»

Як бачимо з рис. 3.18, цей метод передбачає проведення 4 етапів:

- попереднє збагачення в неселективному рідкому живильному середовищі;
- збагачення в рідкому селективному живильному середовищі;
- отримання типових колоній *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) на хромогенному агарі;
- підтвердження продукування жовтого пігменту та біохімічна ідентифікація одержаних культур.

Для попереднього збагачення, первинне (вихідне) розведення дослідної проби в стерильній буферно-пептонній воді, інкубують за температури $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ (18 ± 2) години.

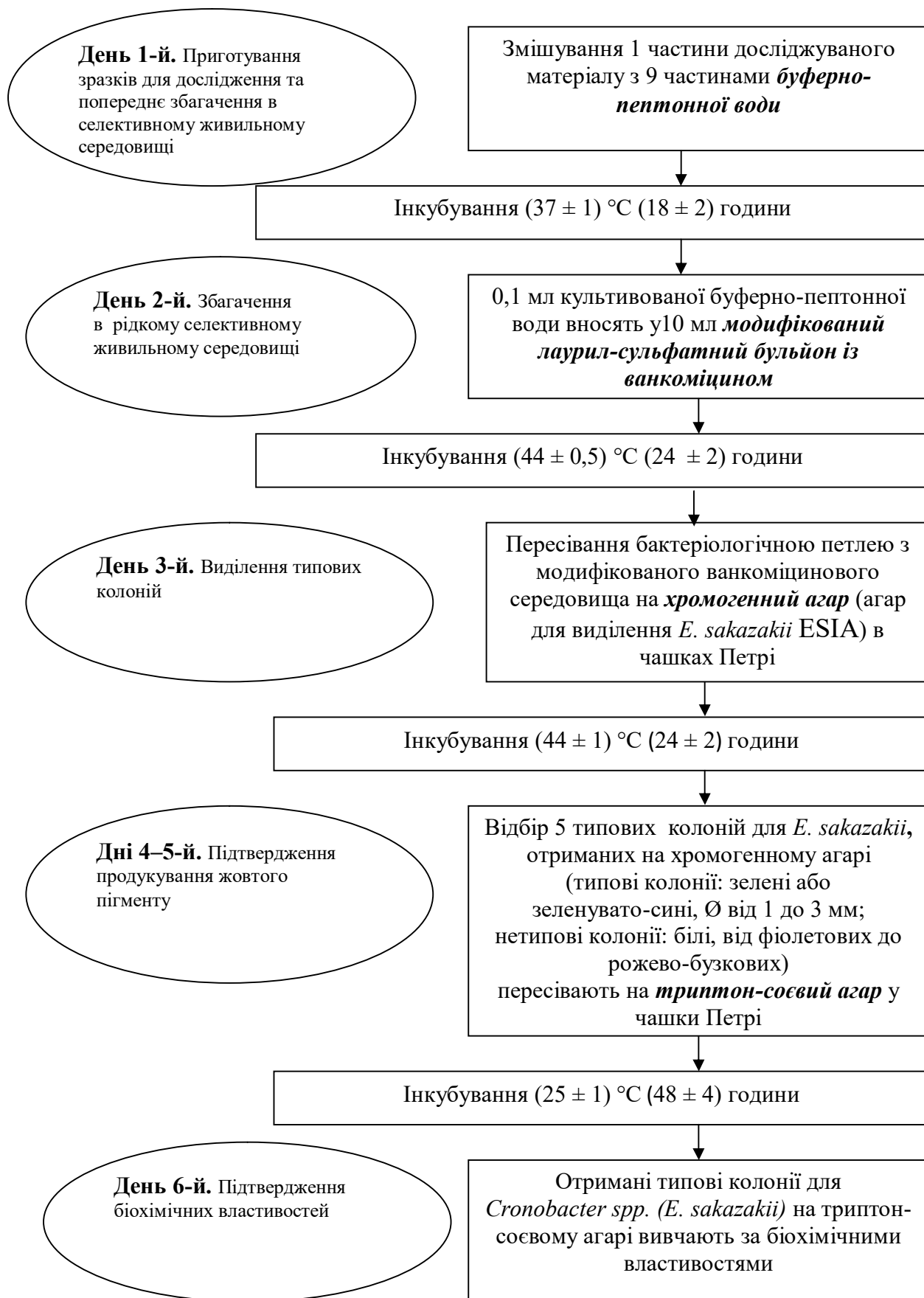


Рисунок 3.19 – Схема виділення *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) згідно з ISO/TS 22964:2006 (E) IDF/RM 210:2006 (E)

Після інкубування первинного (вихідного) розведення дослідної проби в середовищі попереднього збагачення $0,1 \text{ см}^3$ отриманої культури переносять у 10 см^3 модифікованого лаурил-сульфат-триптонового бульйону з ванкоміцином. Витримують за температури $(44 \pm 0,5) \text{ }^\circ\text{C}$ упродовж (24 ± 2) години в термостаті. Допускається використовувати водяну баню, що може постійно підтримувати температуру $44,5 \text{ }^\circ\text{C}$.

Після інкубування на рідкому селективному середовищі збагачення проводять посів штрихами одержаної культури бактеріологічною петлею (близько 10 мкл) на поверхню хромогенного агару для виділення *E. sakazakii* в чашках Петрі. Посіви інкубують за температури $(44 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$ упродовж (24 ± 2) години.

Після інкубування посівів розглядають поверхню агару для виявлення типових колоній *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*). Типові колонії: дрібні, діаметром від 1 до 3 мм, мають колір від зеленуватого до зеленувато-блакитного. Нетипові колонії: злегка прозорі з фіолетовим відтінком.

Для підтвердження продукування жовтого пігменту відбирають від 1 до 5 типових колоній *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*), які засівають штрихом на поверхню триптон-соєвого агару таким чином, щоб після інкубування отримати ізольовані колонії. Інкубування проводять за температури $(25 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$ від 44 до 48 годин. Після цього розглядають поверхню триптон-соєвого агару на наявність колоній, що продукують жовтий пігмент.

У разі, якщо була відібрана лише одна типова колонія та засіяна на поверхню триптон-соєвого агару, але після інкубування не відзначено продукування жовтого пігменту, відбирають ще чотири більш типові колонії і повторюють дослідження відповідно до цього пункту.

Далі проводять виявлення біохімічних властивостей, для цього зазвичай використовують міні-набори чи RapID 20E-тест (рис. 3.13 та 3.14). Для вивчення біохімічних властивостей відбирають одну колонію, що продукує жовтий пігмент на триптон-соєвому агарі.

Виявлення оксидази

Використовуючи скляну піпетку (не потрібно використовувати платиново-іридієві або нікелехромові петлі (!!!)), відбирають частину характерної колонії та розподіляють по поверхні фільтрувального паперу, просякненого реактивом для виявлення оксидази. Тест вважається негативним, якщо колір фільтрувального паперу не змінився на рожево-бузковий, фіолетовий чи насичено-блакитний упродовж 10 с. Можна використовувати комерційні диски (смужки) для оксидазного тесту.

Виявлення L-лізин декарбоксилази

Використовуючи петлю чи скляну піпетку, засівають у товщу L-лізин-декарбоксилазного середовища кожен з відібраних колоній. Інкубування пробірок проводять за температури $(30 \pm 1) ^\circ\text{C}$ (24 ± 2) години. Фіолетовий колір після інкубування свідчить про позитивний результат, жовтий колір – про негативний.

Виявлення L-орнітин декарбоксилази

Використовуючи петлю чи скляну піпетку, засівають у товщу L-орнітин-декарбоксилазного середовища кожен з відібраних колоній. Інкубування пробірок проводять за температури $(30 \pm 1) ^\circ\text{C}$ впродовж (24 ± 2) години. Фіолетовий колір після інкубування свідчить про позитивний результат, жовтий колір – про негативний.

Виявлення L-аргінін дигідролази

Використовуючи петлю чи скляну піпетку, засівають у L-аргінін-дигідролазне середовище кожен з відібраних колоній. Інкубування пробірок проводять за температури $(30 \pm 1) ^\circ\text{C}$ (24 ± 2) години. Фіолетовий колір після інкубування свідчить про позитивний результат, жовтий колір – про негативний.

Ферментація різних вуглеводів

Використовуючи петлю чи скляну піпетку, засівають у товщу кожного середовища для ферментації вуглеводів відібрані колонії. Інкубування пробірок проводять за температури $(30 \pm 1) ^\circ\text{C}$ (24 ± 2) години. Жовтий колір після

інкубування свідчить про позитивний результат, червоний колір – про негативний.

Утилізація солей лимонної кислоти

Використовуючи петлю чи скляну піпетку, відібрані колонії засівають штрихом на скошену поверхню цитратного середовища Сімонса. Інкубування пробірок проводять за температури $(30 \pm 1) ^\circ\text{C}$ (24 ± 2) години. Реакцію вважають позитивною, якщо колір середовища змінився на яскраво-блакитний.

УВАГА! Деякі штами бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*), можуть не утворювати жовтих колоній у ході досліджень, описаних у цих методичних рекомендаціях, оскільки властивість продукувати пігмент може втрачатися в результаті пересівання культур. У такому разі, використовуючи цей метод, можна повторити досліди з цими культурами.

Опрацювання результатів із використанням цього методу оцінюють за кожною пробою окремо. У пробі констатують наявність бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*), якщо отримані на хромогенному середовищі типові колонії при пересіванні їх на триптон-соевий агар утворюють колонії жовтого кольору, що проявляють характерні біохімічні властивості (не ферментують оксидазу та L-лізин декарбоксилазу і ферментують L-орнітин декарбоксилазу та L-аргінін дигідролазу). Інтерпретацію результатів проводять відповідно до таблиці 3.32.

Таблиця 3.32 – Інтерпретація результатів

Показник	Позитивна чи негативна реакція	Наявність <i>Cronobacter spp.</i> (<i>E. sakazakii</i>)
1	2	3
Продукування жовтого пігменту	+	> 99
Оксидаза	–	> 99
L-лізиндекарбоксилаза	–	> 99
L-орнітиндекарбоксилаза	+	± 90
L-аргініндигідролаза	+	> 99

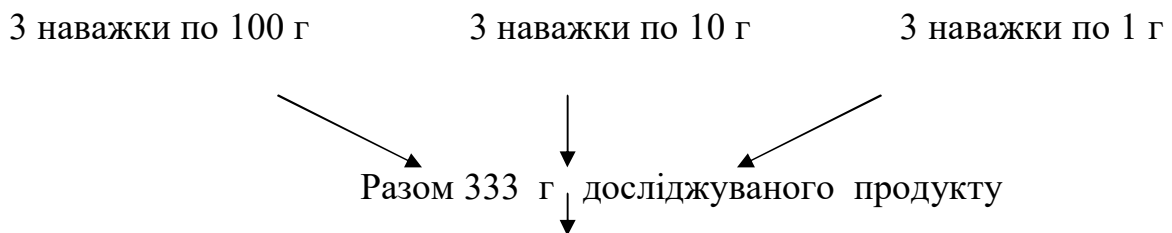
Продовження таблиці 3.32

1	2	3
Утворення кислоти від ферментації:	–	± 95
– D-сорбітолу	+	> 99
– L-рамнози	+	> 99
– D-цукрози	+	> 99
– D-мелібіози	+	> 99
– амігдаліну	+	> 95
– солей лимонної кислоти		

FDA-метод виділення та підрахунку кількості бактерій Cronobacter spp. (E. sakazakii) шляхом встановлення їх найбільш вірогідної кількості.

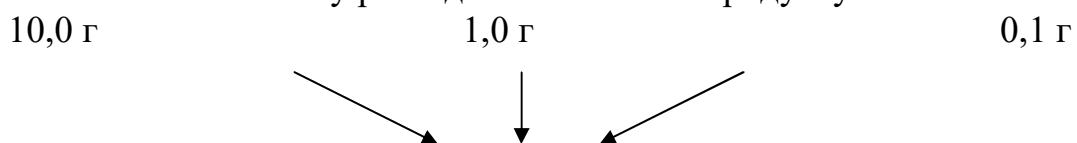
Метод базується на посіві певної кількості продукту (333) на рідкі збагачувальні середовища з подальшим пересіванням на поверхню густих селективних середовищ з метою виявлення типових для *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* колоній, підтвердженням за біохімічними властивостями та встановленням найбільш вірогідної кількості (НВК) бактерій у досліджуваній пробі продукту. Схема методу наведена на рис. 3.19.

Відбір та готування проб до контролювання:



Приготування первинних десятикратних розведень (1:9) у пептонно-сольовому розчині або забуференої пептонної води (9 см³, 90 см³ та 900 см³ відповідно), дозволяється підігрівання до 45 °С – до повного розчинення та отримання першого збагачення культур.

У кожному розведенні міститься продукту по:



Інкубування за температури $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ впродовж (18 ± 2) години



Приготування вторинного розведення та отримання повторного збагачення культуру бульйоні для бактерій родини *Enterobacteriaceae*:

1 см³ із кожного розведення збагаченої культури вносять у 9 см³ бульйону.
У кожному розведенні міститься продукту по:

1,0 г

0,1 г

0,01 г



Інкубування за температури $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ впродовж (18 ± 2) години



Виділення колоній мікроорганізмів, підозрілих на бактерії *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*): посів збагаченої культури на поверхню глюкозо-жовчного агару з кристалічним фіолетовим та нейтральним червоним у чашках Петрі для отримання окремих колоній.

На кожне розведення використовують по 2 чашки Петрі (за необхідності з метою одержання ізольованих необхідно зробити такі розведення (від 10^{-4} до 10^{-6}) у стерильному бульйоні для бактерій родини *Enterobacteriaceae*)

з кожного розведення по 0,1 см³ збагаченої культури піпеткою наносять на поверхню агару та рівномірно розподіляють по поверхні агару за допомогою стерильного шпателя

з кожного розведення збагаченої культури бактеріологічною петлею наносять штрихами на поверхню агару 3 мм (10 мкл)



Інкубування за температури $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ впродовж (18 ± 2) години



Підтвердження підозрілих колоній на належність до бактерій *E. sakazakii* (*Cronobacter spp.*): Підозрілі (пурпурні) колонії на *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) засівають штрихом на поверхню триптон-соєвого агару



Інкубування за температури (25± 1) °С впродовж 48–72 годин (відзначають утворення колоній із жовтим пігментом)

↓
Біохімічна ідентифікація за допомогою АРІ-20Е-системи

↓
Опрацювання результатів та підрахування кількості *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) встановленням НВК

Рисунок 3.19 – Схема методу підрахунку кількості бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) шляхом устанавлення найбільш вірогідної кількості

У таблиці 3.33 наведено комерційні середовища, які застосовують згідно з цим методом.

Таблиця 3.33 – Комерційні середовища, які застосовують для FDA-методу

Назва середовища	Каталожний номер та фірма-виробник або дистриб'ютор
Буферно-пептонна вода (суха) (Buffered Peptone Water, BPW)	M 614, HiMedia; 1.07228.0500, Merck; CM 0509, Oxoid
Бульйон для бактерій родини <i>Enterobacteriaceae</i> або бульйон Моселла (Enrichment broth medium (Enterobacteria enrichment broth-Mossel) EEBroth, EEBroth, Mossel)	1.05394.0500, Merck; M287, HiMedia
Агар глюкозо-жовчний із кристалічним фіолетовим та нейтральним червоним (Violet Red Bile Glucose Agar without Lactose, VRGB agar)	M049, HiMedia; 1.10275.0500, Merck
Триптон-соевий агар (Tryptone Soya agar)	M290, HiMedia; CM0131, Oxoid
АРІ 20Е-система для біохімічної ідентифікації <i>Enterobacteriaceae</i> та інших грам-негативних паличок	20100, «BioMerieux»

Цей метод передбачає проведення 4 етапів:

- приготування первинних десятикратних розведень досліджуваної проби та отримання першого збагачення культур;
- приготування вторинного розведення та отримання повторного збагачення культуру бульйоні для бактерій родини *Enterobacteriaceae*;
- виділення колоній мікроорганізмів, підозрілих на бактерії *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*, на щільних середовищах;
- підтвердження підозрілих колоній на належність до бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* (продукування жовтого пігменту та біохімічна ідентифікація).

Приготування первинних десятикратних розведень досліджуваної проби та отримання першого збагачення культур. Підготовлені для дослідження проби продукту, додержуючись правил асептики, зважують у стерильних чашках Петрі чи в бюксах таким чином: три наважки по 100 г, три наважки по 10 г та три наважки по 1 г і вносять у стерильні колби 2 000, 250 і 125 см³ відповідно.

Додають у колби 9-кратний об'єм пептонно-сольового розчину або забуференої пептонної води, щоб отримати розведення 1:10 (10^{-1}). До зразків вагою 100 г додають 900 см³ розчинника, при цьому отримують концентрацію продукту 10 г/см³ розчину. До зразків вагою 10 г додають 90 см³ розчинника, при цьому отримують концентрацію продукту 1 г/см³ розчину. До зразків вагою 1 г додають 9 см³ розчинника, при цьому отримують концентрацію продукту 0,1 г/см³ розчину.

Так отримують первинні розведення зразків 10^{-1} , з концентраціями продукту в них 10, 1 та 0,1 г в см³.

Вміст колб обережно перемішують струшуванням вручну до повного розчинення або із застосуванням ВаgMixer чи вортекс. Дозволяється підігрівання колб із умістом до 45 °С до повного розчинення проби.

Отримані таким чином розведення залишають у термостаті за температури $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ упродовж (18 ± 2) години для отримання першого збагачення культур.

Приготування вторинного розведення та отримання повторного збагачення культуру бульйоні для бактерій родини *Enterobacteriaceae*. До 9 см^3 бульйону збагачення для бактерій родини *Enterobacteriaceae*, який попередньо розлитий у стерильні пробірки, додають по 1 см^3 кожного первинного розведення.

Так отримують вторинні розведення $1:100$ (10^{-2}) з такими концентраціями продукту: для зразків вагою $100\text{ г} - 1\text{ г/см}^3$ розчину, для зразків вагою $10\text{ г} - 0,1\text{ г/см}^3$ розчину, для зразків вагою $1\text{ г} - 0,01\text{ г/см}^3$ розчину.

Для отримання повторного збагачення культур вторинні розведення інкубують у термостаті за температури $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ впродовж (18 ± 2) години.

Виділення колоній мікроорганізмів, підозрілих на бактерії *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* на щільних середовищах. Уміст кожної колби з повторно збагаченою культурою незалежно від наявності чи відсутності росту обережно перемішують струшуванням (чи на вортексі) та проводять прямий посів на поверхню глюкозо-жовчного агару з кристалічним фіолетовим та нейтральним червоним у чашки Петрі для отримання ізольованих колоній. На кожне розведення використовують по 2 чашки Петрі (при очікуванні надмірного росту культури необхідно зробити ряд розведень, найкраще від 10^{-4} до 10^{-6} у стерильному бульйоні для бактерій родини *Enterobacteriaceae*).

Висівання із середовища збагачення проводять одним із таких методів:

метод I: по поверхні агару за допомогою стерильного шпателя розподіляють $0,1\text{ см}^3$ збагаченої культури для отримання поодиноких колоній;

метод II: по поверхні агару за допомогою бактеріологічної петлі ($\varnothing 3\text{ мм}$, 10 мкл) проводять посів штрихом для отримання поодиноких колоній.

Чашки Петрі з посівами витримують у термостаті за температури $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ упродовж (18 ± 2) години.

Після інкубування перевіряють посіви на відсутність чи наявність росту мікроорганізмів. За відсутності росту на поверхні глюкозо-жовчного агару з кристалічним фіолетовим та нейтральним червоним контроль припиняють і дають висновок про відсутність бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* у досліджуваних пробах продукту.

При виявленні росту мікроорганізмів на поверхні глюкозо-жовчного агару з кристалічним фіолетовим та нейтральним червоним відбирають по 5 поодиноких підозрілих на бактерії *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* колоній із кожної чашки для подальшого вивчення та встановлення виду. Підозрілі колонії мають червоний колір із фіолетовим відтінком (пурпурні) та фіолетовим ореолом навколо них.

Підтвердження підозрілих колоній на належність до бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* (продукування жовтого пігменту та біохімічна ідентифікація). Кожну з п'яти вибраних колоній мікроорганізмів, підозрілих на *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*, пересівають за допомогою бактеріологічної петлі штрихом на поверхню триптон-соевого агару в чашках Петрі для виявлення характерних колоній із жовтим пігментом. Посіви інкубують у термостаті за температури $(25 \pm 1) ^\circ\text{C}$ упродовж 48–72 годин.

Культури, які на триптон-соевому агарі ростуть у вигляді колоній із жовтим пігментом, підлягають подальшому біохімічному вивченню для підтвердження належності до виду *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*.

Підтвердження проводять біохімічною ідентифікацією з використанням тест-систем API-20E та постановкою оксидазного тесту.

Підрахування кількості бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* здійснюють шляхом підтвердження наявності цих ідентифікованих бактерій у серійних розведеннях $(333 \pm 0,5)$ г досліджуваного продукту.

Залежно від отриманої комбінації позитивних чи негативних результатів для кожного розведення проб досліджуваного продукту складають тризначне число (індекс), за яким, використовуючи таблицю 3.34, знаходять

найімовірнішу кількість бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*, що відповідає їх умісту в 1 г продукту.

Проведення розрахунку кількості *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* в 100 г продукту встановлюється шляхом множення кількості НВК, яка взята з таблиці відповідно до встановленого індексу, на 100, а в 10 г продукту – на 10.

Наприклад: Бактерії *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* були ідентифіковані в трьох зразках продукту масою 100 г, у трьох зразках продукту масою 10 г та в одному зразку продукту масою 1 г. Результат записується у вигляді індексу 3:3:1, що відповідає НВК 46 КУО в 1 г продукту відповідно до таблиці 3.34.

Якщо результат дорівнює індексу 3:3:3, а значення НВК становить більше ніж 110 КУО в одному грамі, дослідження цього продукту необхідно повторити, використовуючи більші розведення проб, в яких вихідна концентрація досліджуваного продукту буде в 10 і 100 разів нижчою, аніж першочергова.

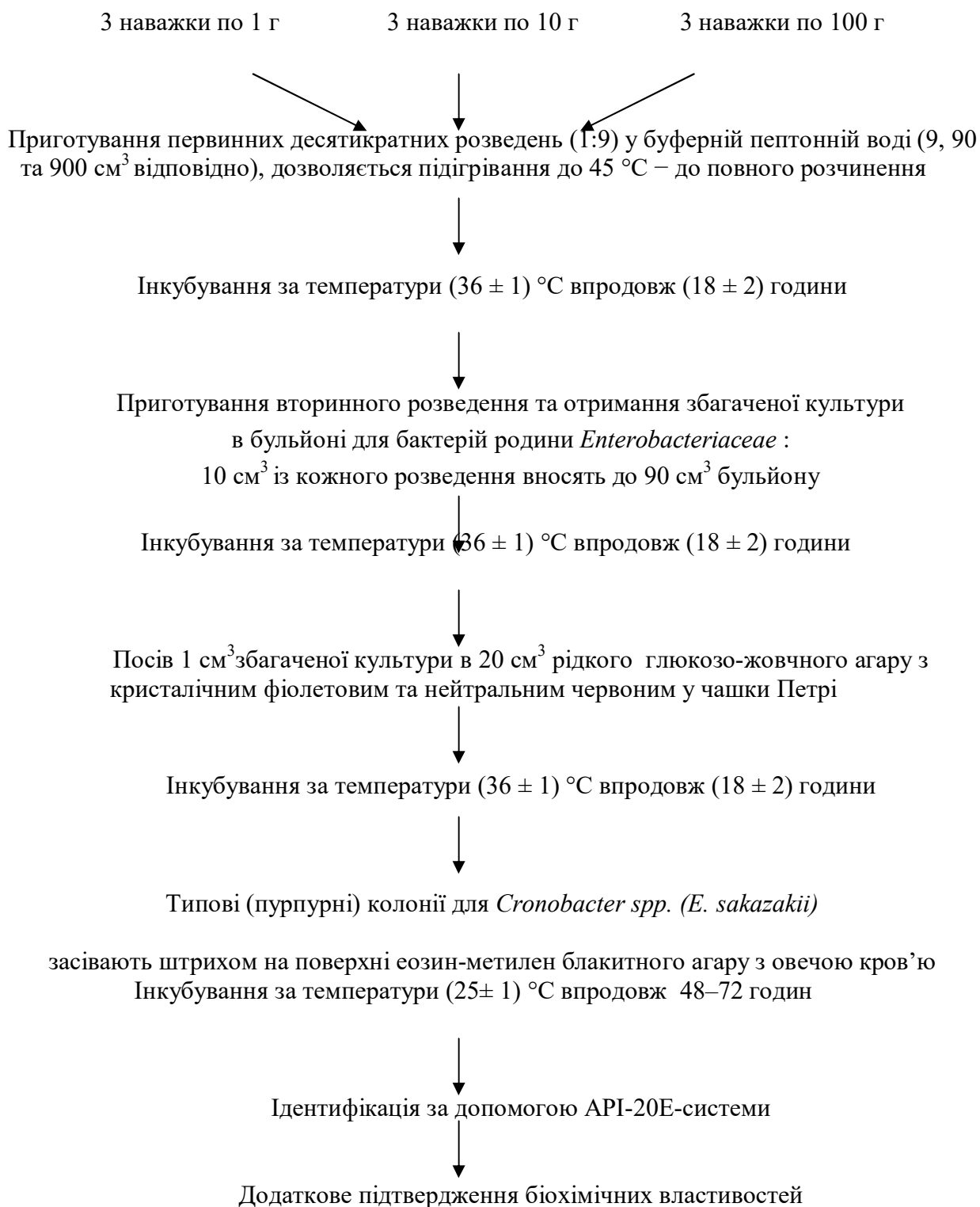
Протокол досліджень повинен висвітлювати:

- повну інформацію, необхідну для ідентифікації проби;
- метод відбору проб, який використовували;
- метод досліджень, що використовували, з однозначним посиланням на ці методичні рекомендації;
- усі деталі проведення дослідження, не зазначені у цих методичних рекомендаціях, що можуть вплинути на результат досліджень.

Таблиця 3.34 – Таблиця для встановлення найбільш вірогідної кількості бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*)

Підтвердження наявності бактерій <i>Cronobacter spp.</i> (<i>E. sakazakii</i>) (в трьох розведеннях досліджуваної проби продукту)			НВК, КУО/г	Довірчі межі кількості мікроорганізмів одному грамі продукту з імовірністю			
1,0	0,1	0,01		95 %		99 %	
				від	до	від	до
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	00	1,60
0	1	1	0,61	0,12	1,7	0,05	2,50
0	2	0	0,62	0,12	1,70	0,05	2,50
0	3	0	0,94	0,35	3,3	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	1,1	0,4	3,5	0,2	4,6
1	1	0	0,74	0,13	2,00	0,06	2,7
1	1	1	1,1	0,4	3,5	0,2	4,6
1	2	0	1,1	0,4	3,5	0,2	4,6
1	2	1	1,5	0,5	3,8	0,2	5,2
1	3	0	1,6	0,5	3,8	0,2	5,2
2	0	0	0,92	0,15	3,50	0,07	4,60
2	0	1	1,4	0,4	3,5	0,2	4,6
2	0	2	2,0	0,5	3,8	0,2	5,2
2	1	0	1,5	0,4	3,8	0,2	5,2
2	1	1	2,0	0,5	3,8	0,2	5,2
2	1	1	2,0	0,5	3,8	0,2	5,2
2	1	2	2,7	0,9	9,4	0,5	14,2
2	2	0	2,1	0,5	4,0	0,2	5,6
2	2	1	2,8	0,9	9,4	0,5	14,2
2	2	2	3,5	0,9	9,4	0,5	14,2
2	3	0	2,9	0,9	9,4	0,5	14,2
2	3	1	3,6	0,9	9,4	0,5	14,2
3	0	0	2,3	0,5	9,4	0,3	14,2
3	0	1	3,8	0,9	10,4	0,5	15,7
3	0	2	6,4	1,6	18,1	1,0	25,0
3	1	0	4,3	0,9	18,1	0,5	25,0
3	1	1	7,5	1,7	19,9	1,1	27,0
3	1	2	12	3	36	2	44
3	1	3	16	3	38	2	52
3	2	0	9,3	1,8	36,0	1,2	43,0
3	2	1	15	3	38	2	52
3	2	2	21	3	40	2	56
3	2	3	29	9	99	5	152
3	3	0	24	4	99	5	152
3	3	1	46	9	198	5	283
3	3	2	110	20	400	10	570
3	3	3	> 110				

Відбір та готування проб до контролювання:



Опрацювання результатів та підрахування кількості *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*)

Рисунок 3.20 – Схема методу визначення кількості бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) шляхом установлення найбільш вірогідної кількості (Європейський метод)

Відбір та готування проб до контролювання:

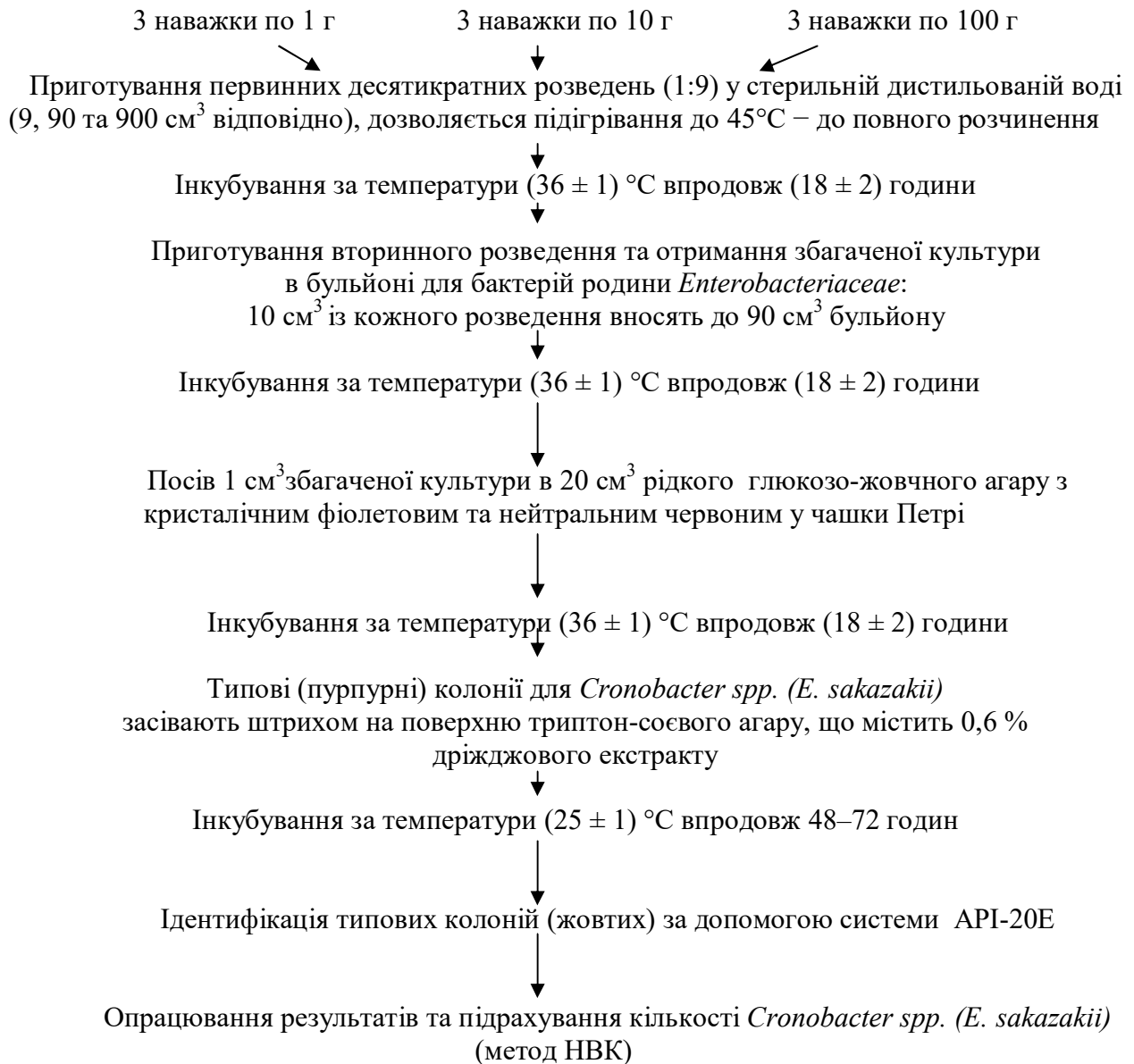


Рисунок 3.21 – Схема методу визначення кількості бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* шляхом встановлення найбільш вірогідної кількості (Канадський метод)

Для виявлення бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* ПЛР-методом із визначенням наявності гена, що відповідає за глюкозидазну активність (α -glucosidase gene (*gluA*)), використовують два види праймерів: короткі EsAg5f (5'-TATCAGATCTACCCGCGC-3') і EsAg5_5r (5'-TTGATGCCAAGCTGTTGC-3') та довгі EsAgf (5'-TGAAAGCAATCGACAAGAAG-3') і EsAgr (5'-ACTCATTACCCCTCCTGATG-3').

Нижче в таблиці 3.35 та 3.36 наведено ряд праймерів, які були використані науковцями з різних країн для постановки ПЛР щодо ідентифікації *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*.

Таблиця 3.35 – Перелік праймерів для ПЛР

Локалізація гена	Назва гена	Література
1	2	3
Рибосомальна ДНК , рДНК (rDNA)	16SrRNA 23SrRNA tRNAGlu FISH	Keyser et al.,2003 Lehner et al., 2004
1,6 а-глюкозидаза	<i>gluA</i>	A. Lehner, S. Nitzsche, 2006
MMS-оперон	<i>dnaG</i>	K. H. Seo, R. E. Brackett, 2005
Цинковмісна металопротеаза (Zinc-containing metalloprotease)	<i>zpx</i>	
Мембранні протеїни (membrane protein)	<i>ompA</i>	Mohan Nair and Venkitanarayanan, 2006

Таблиця 3.36 – Перелік променів для ПЛР та їх характеристика

	Праймер (його назва та послідовність)	ПЦР-програма	bp	Література
1	2	3	4	5
16S rRNA				
1	Esak2 (5'-CCCGCATCTCTGCAGGATTCTC-3)	35x: 95 °C-35s, 61 °C-60s, 72 °C-60s	900	Keyser et al., 2003
2	Esak3 (5'-СТААТАССGCАТААСGТСТАСG-3)			
3	Esakf (5'-GCTYTGCTGACGAGTGGCGG-3)	30x: 94 °C-30s, 64 °C-64s, 72 °C-90s	929	Lehner et al., 2004
4	Esakr (5'-ATCTCTGCAGGATTCTCTGG-3)			
5	660-V-1 (5'-AGAGTTTGATYMTGGCTC-3)	30X: 95 °C-15s, 52 °C-30s; 72 °C-90s	1450	Lehner et al., 2004
6	630R (5'-САКААAGGAGGTGATCC-3)			
	6-carboxyfluorescein-ACAGAGTAGTAGTTGTAGAGGCCGTGCTTCC)	<i>dnaG</i>		K. H. Seo, R. E. Brackett, 2005
ген <i>gluA</i>				
	EsAgf (EsgluAf) (5'-TGAAAGCAATCGACAAGAAG-3')		1680 bp	A. Lehner, S. Nitzsche, 2006

Продовження таблиці 3.36

1	2	3	4	5	
	EsAgr (Es gluAf) (5'-ACT CAT TAC CCC TCC TGA TG-3')				
	EsAg5f (5'-TAT CAG ATC TAC CCG CGC-3')	<i>gluA</i>	105- bp		
	EsAg5_5r (5'-TTGATGCCAAGCTGTTGC-3')				
<i>ompA</i>-targeted PCR					
5	ESSF (5_-GGATTTAACCGTGAAC TTTTCC-3_)	<i>ompA</i>	469- bp	Mohan Nair and Venkitanarayanan, 2006	
6	ESSR (5-CGCCAGCGATGTTAGAAGA-3_)				
Real-timePCR					
7	Entsa-F 1 (5-CCAAAGCTTCCGCAGTGAA-3) (Acc.-number L01755)		19 bp	Heuvelinket, 2004	
8	Entsa-R 1 (5-CAATATCCCCTGAGGAATTAGTACAGA-3) (Acc.-number L01755)		27 bp		
9	Entsa-S 1 (5-FAM-CGTCACGCGAAGAACTGGCTCG- TAMRA-3) (Acc.-number L01755)		23 bp		
10	IPC-F (5-TGTGAAATACCGCACAGATG-3) (Acc.-number L09137)		20 bp		
11	IPC-R (5-AGCTGGCGTAATAGCGAAG-3) (Acc.-number L09137)		19 bp		
12	IPC-S (5-HEX-GAGAAAATACCGCATCAGGC- TAMRA-3) (Acc.-number L09137)		20 bp		
13	Entsa-F 2 (5-CCGGAACAAGCTGAAAATTGA-3) (Acc.-number AY748357)		21 bp		Liu et al., 2006
15	Entsa-R 2 (5-TCTTCGTGCTGCGAGTTTG-3) (Acc.-number AY748357)		19 bp		
16	Entsa-S 2 (5-FAM-ACTCTGACACACCGCGCATTCCCTG- TAMRA-3) (Acc.-number AY748357)		24 bp		
17	IPC-F (5-TGTGAAATACCGCACAGATG-3) (Acc.-number L09137)		20 bp		
18	IPC-R (5-AGCTGGCGTAATAGCGAAG-3) (Acc.-numberL09137)		19 bp		

Продовження таблиці 3.36

1	2	3	4	5
19	IPC-S (5-HEX-GAGAAAATACCGCATCAGGC- TAMRA-3) (Acc.-number L09137)		20 bp	

Автори цієї монографії визначили можливість використання для молекулярно-генетичного аналізу гена 16SrRNA щодо виявлення та ідентифікації бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* методом полімеразної ланцюгової реакції. Ізоляти *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* були виділені із сирого молока та об'єктів молочних ферм Сумської області. Було досліджено 25 проб сирого збірного молока корів, 30 змивів із доїльних апаратів, молочних бідонів та молочних танків, поверхонь шкіри тіла та вим'я корів, підлоги тваринницьких приміщень, посівів із повітря тваринницьких приміщень. Розроблення та аналіз високоспецифічних олігонуклеотидних праймерів для полімеразної ланцюгової реакції проводили на базі відділу молекулярної біології та імунохімії Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів (м. Київ). Усі олігонуклеотидні праймери, що фланкують фрагменти гена 16SrDNA, були розраховані за допомогою програмного забезпечення «VectorNTI»v.11.0.1 (Invitrogen) та синтезовані в «ThermoHybaid. BioSciences» (Німеччина).

Для аналізування гомології нуклеотидної послідовності ДНК *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* з генами інших бактерій використовували електронну службу BLAST 2.0 Національного центру біотехнологічної інформації (NCBI) (США) та модуль «AlignX» програмного забезпечення «VectorNTI».

Оскільки *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* має широкі філогенетичні зв'язки з іншими представниками роду *Enterobacter spp. (E. cloacae, E. herbicola, E. agglomerans)*. та родом *Pantoea (P. agglomerans)*, це дещо ускладнює їх диференціацію молекулярно-генетичними методами. За даними наукової літератури, в багатьох країнах проводяться дослідження з підбору для

молекулярної діагностики *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* генів-мішеней (16SrRNA, gluA, ompA, gyrB; MMS-оперон (dnaG, rpsU, rpoD)), які б забезпечили необхідну ймовірність щодо виявлення та ідентифікації збудника.

У результаті проведеного пошуку та аналізу послідовностей генів із консервативними та варіабельними ділянками у бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* були розроблені кілька пар олігонуклеотидних праймерів, специфічних для різних ділянок гена 16SrRNA (табл. 3.37, рис. 3.20).

Таблиця 3.37 – Пари олігонуклеотидних праймерів, специфічних для різних ділянок гена 16SrRNA та послідовності генів із консервативними та варіабельними ділянками у бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*

Праймер	Послідовність (5'→3')	Розмір фрагмента (п. н.)
d16sakF1	ТААСТССТГТССАСТССТ	451
d16SsakR	ТАААССАСТГСТССАСССТ	
d16SsakF3	ГСТССТСТТГАСТСТСТ	314
2d16S-F	АСТААТАСССТААСТСТССТ	863
2d16S-R	АСТССТСССТССТСТСТ	

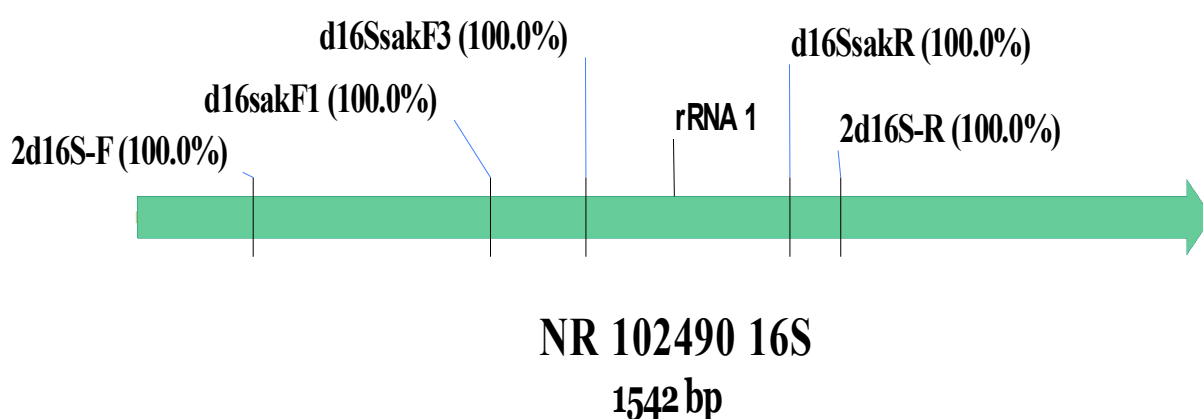


Рисунок 3.20 – Характеристика гомології олігонуклеотидних праймерів на гені 16SrRNA *Cronobacter sakazakii* (ATCCBAA-894)

Завершальним етапом роботи було випробувати праймери, які ми розробили та провести оптимізацію умов проведення ПЛР. Під час використання цих праймерів у ПЛР із ДНК виділених ізолятів бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) були отримані попередні позитивні результати з 20 ізолятами, з яких один був контамінований бактерією *Yersinia enterocolityca*. Результати проведеної роботи наведено на рис. 3.21 та 3.22.



М 1 2 3 4 5 К-

Рисунок 3.21 – Результати електрофоретичного аналізу продуктів ПЛР із праймерами d16sakF1/d16SsakR: М-маркер «100 bpPlusDNALadder» (Fermentas); 1, 2 – депонований штам *Cronobacter sakazakii* (ДНКБШМ); 3 – ізолят 1 (колектор); 4 – ізолят 2 (вим'я); 5 – ізолят 3 (корм); К(-) – негативний контроль

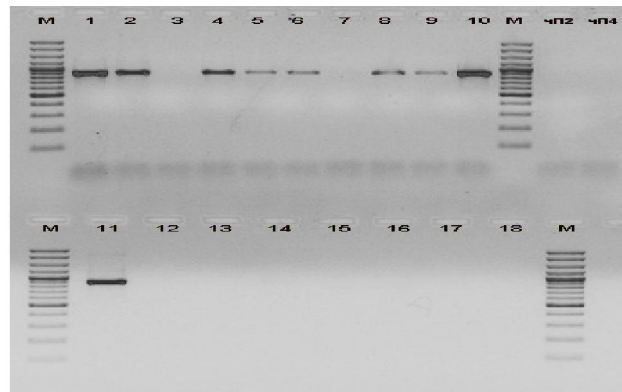


Рисунок 3.22 – Результати електрофоретичного аналізу продуктів ПЛР із праймерами 2d16S-F/d16SsakR: М-маркер «100 bpPlusDNALadder» (Fermentas); 1–18 – виділені ізоляти; чп2 та чп4 – гетерологічні негативні контролю (*B. subtilis*, *E. coli*)

Ураховуючи значну гомологію між послідовностями гена 16SrRNA *Cronobacter spp.* та *Enterobacter cloace*, одержані в ПЛР результати розглядаємо як проміжні (попередні) й усі виділені ізоляти необхідно додатково охарактеризувати за геном *otrA*. Отже, на нашу думку та думку більшості науковців, достовірна ідентифікація *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) на цей час можлива лише за умови використання комплексного підходу, що базується на комбінуванні як класичних методів дослідження (мікроскопія, культуральні та біохімічні характеристики), так і молекулярно-генетичних (ПЛР, секвенування гена 16SrRNA).

РОЗДІЛ 4

ОЦІНКА ЕКСПОЗИЦІЇ (ВПЛИВУ)

Оцінка експозиції спрямована на встановлення фактичної або очікуваної кількості патогенних мікроорганізмів, що надходять до організму людини внаслідок споживання харчових продуктів.

У процесі оцінки експозиції визначається рівень контамінації харчових продуктів досліджуваним мікроорганізмом з урахуванням його життєвого циклу і навіть часу, частоти й тривалості їх впливу на макроорганізм.

Для оцінки експозиції необхідний досить великий набір даних, що характеризують:

- харчовий продукт (опис продукту, способів його вживання і виробника; продуктів, що вживаються разом із досліджуваним; здатність продукту бути живильним середовищем для мікроорганізмів; час зберігання);

- харчовий ланцюг (результати мікробіологічного дослідження компонентів продукту, умови виробництва продукту, зберігання, транспортування, застосування мийних і дезінфекційних засобів та ін.);

- мікробіологічну небезпеку (поширення і рівень мікробіологічного забруднення в початковій точці; зміна поширення мікробіологічного забруднення на різних стадіях харчового ланцюга; забрудненість тари, обладнання тощо);

- споживача (стать, вік, стан здоров'я, соціально-економічні фактори, частота та обсяги споживання продукту, тривалість і умови зберігання продукту у споживача, умови приготування та оброблення).

На етапі оцінки експозиції необхідне формування різних сценаріїв впливу, що враховують усі потенційні фактори передавання збудника, рівні вмісту патогенних мікроорганізмів у харчових продуктах. При формуванні сценаріїв необхідно враховувати принцип «найкращих і найгірших оцінок» з оцінкою імовірності реалізації оптимістичного й песимістичного сценаріїв. Відповідно до завдань оцінки ризику експозиція може розраховуватися на

основі середніх величин, найбільш імовірних або з урахуванням частки споживачів продукції.

Прогнозуюча мікробіологія як частина кількісної оцінки мікробіологічного ризику. Мікробіологічний контроль сировини та харчових продуктів тваринного походження вважають одним з основних заходів профілактики харчових отруєнь та захворювань людини. Цей контроль базується на методах посіву та подальшій ідентифікації мікроорганізмів, що займає досить значний період часу (від 36–72 год і більше). Крім того, вищезазначені методи не відображають динаміки росту та розмноження мікроорганізмів у сировині та харчових продуктах тваринного походження за умов дії на них різних факторів.

Вивчення поведінки мікроорганізмів із застосуванням факторного аналізу до останнього часу мали лише дослідницький характер і були трудомісткими й тривалими. На цей час, із розвитком науково-технічного прогресу, передбачити поведінку мікроорганізмів можна за короткий термін за допомогою математичних і статистичних формул чи математичних моделей [2–5, 7, 8, 12, 22, 156, 168, 176].

Прогнозуюча мікробіологія (предиктивна мікробіологія – predictive microbiology) є новим напрямком у мікробіології продуктів харчування, що передбачає використання елементів власне мікробіології, математики та інших статистичних методів для встановлення чи передбачення кількісного росту мікроорганізмів та їх поведінки (виживання, резистентності чи загибелі) на різноманітні параметри довкілля (температуру, активність води, вологість, наявність супутньої мікрофлори, співвідношення солей, кислот чи інших хімічних речовин) [7, 8, 12, 22, 156, 168, 176, 203].

Огляд літератури свідчить про те, що прогнозуюча мікробіологія набула великого поширення за останні 20 років у високорозвинених країнах, таких як Англія [197, 198], Сполучені Штати, Австралія [442], Бельгія [468], Канада. З кожним роком збільшується кількість наукових публікацій з цієї теми. У країнах СНД існує кілька літературних посилань про застосування підходів та

елементів прогнозуючої мікробіології в харчовій мікробіології [2–5, 7, 8, 12, 22, 156].

Кількісний стан мікроорганізмів у продукті чи сировині насамперед залежить від параметрів дії ряду факторів, які умовно поділяють на зовнішні та внутрішні (рис. 4.1).



Рисунок 4.1 – Фактори, що впливають на ріст, розмноження чи відмирання мікроорганізмів у харчових продуктах

Як свідчать дані, наведені на рис. 4.1, на ріст, розмноження та відмирання мікроорганізмів впливає велика кількість факторів і врахувати їх дію одночасно дуже важко і навіть неможливо. Тому на допомогу залучають сучасну методологію прогнозуючої мікробіології.

Отже, кількість мікроорганізмів у продукті чи сировині залежить від комбінацій дій зовнішніх та внутрішніх факторів. Врахувати ці комбінації та передбачити наслідки їх дії в кількісному вигляді можна лише при математичних і статистичних розрахунках. Це й є основою прогнозуючої, чи предиктивної, мікробіології [8, 12, 22, 156, 168, 176, 203].

Прогнозуюча, або предиктивна, мікробіологія – це сучасний напрямок щодо контролю за мікробіологічними небезпеками в продовольчій сировині та харчових продуктах із застосуванням математичних моделей і статистичних методів. Це новий підхід щодо встановлення та передбачення змін у кількісному стані мікроорганізмів (ріст, розмноження чи загибель) у сировині чи продуктах за дії на них різноманітних параметрів довкілля (температури, вологості, наявності іншої мікрофлори, співвідношення солей, кислот чи інших хімічних речовин).

Започаткування цього напрямку мікробіології було пов'язане з гострою необхідністю контролю за ростом, розмноженням чи відмиранням умовно-патогенних і патогенних мікроорганізмів у сировині та харчових продуктах тваринного походження [197, 198, 442, 468]. Ця інформація була особливо необхідною як контроль терміну зберігання харчових продуктів та під час виробництва нових видів продуктів. Мікроорганізми потребують певних умов для підтримання їх росту та виживання. Передусім це наявність сприятливої температури, поживних речовин, вологості, відношення солей і кислот у середовищі, де вони існують.

На основі результатів наукових досліджень динаміки росту та розмноження мікроорганізмів у сировині та харчових продуктах за умови дії різних чинників були побудовані математичні моделі факторного аналізу [197, 198, 442, 468].

Першим методологічним підходом у математичному моделюванні є багатофакторний аналіз життєдіяльності мікроорганізмів у харчових продуктах. Другий методологічний підхід базується на визначенні впливу різних факторів на життєдіяльність мікроорганізмів у продовольчій сировині та харчових продуктах залежно від фази розвитку. Як відомо, ріст, розмноження чи відмирання мікроорганізмів незалежно від умов середовища проходять чотири фази.

Під час першої фази, або lag-фази, мікроорганізми адаптуються до умов довкілля, тому розмноження мікроорганізмів практично не відбувається, вони

перебувають у стані спокою. Тривалість цієї фази залежить від кількості та фізіологічного стану мікроорганізмів. Якщо мікроорганізми молоді життєздатні, то вони швидко адаптуються до умов зовнішнього середовища й відразу починають розмножуватися. Друга фаза – фаза росту, під час якої відбуваються інтенсивне розмноження і збільшення мікроорганізмів у логарифмічній прогресії, тому цю фазу ще називають log-фазою. У цій фазі ріст мікроорганізмів залежить від дії параметрів довкілля (температури, вологості, рН тощо), а не від фізіологічного стану мікроорганізмів. Саме в цій фазі накопичуються токсичні продукти метаболізму, тому швидкість розмноження мікроорганізмів поступово знижується поряд зі зростанням їх загибелі. У певний момент співвідношення між загибеллю старих мікробних клітин та утворенням нових досягає рівноваги. Третя фаза називається фазою стабільності, чи стаціонарною фазою. З часом утворення нових мікробних клітин повністю припиняється, а існуючі клітини повільно гинуть. За стаціонарною фазою настає четверта фаза загибелі, чи відмирання, мікробних клітин [8, 12, 22, 156, 168, 176, 203, 376–378, 468].

Отже, важливим аргументом на користь прогнозуючої мікробіології є те, що поведінка мікроорганізмів у харчових продуктах оцінюється за дією не одного конкретного фактора чи параметра довкілля, а за дією сукупності факторів і, найголовніше, тривалості їх дії в одній із чотирьох фаз росту, розмноження чи відмирання мікроорганізмів. Важливе значення, також має врахування вихідної кількості мікроорганізмів у сировині чи готовому харчовому продукті [8, 12, 22, 156, 168, 176, 376–378, 468].

На підставі такого комплексного аналізу прогнозуюча мікробіологія стає надійним інструментом у здійсненні контролю за мікробіологічними небезпеками на всьому харчовому ланцюзі «від лану до столу». Прогнозуюча мікробіологія – це мультидисциплінарна наука, що комбінує математичне моделювання з експериментальними даними. Математичні моделі, які застосовують у прогнозуючій мікробіології, поділяють на первинну, вторинну й третинну [468].

Первинні моделі відображають зміни щодо кількості мікроорганізмів із часом, пов'язані з дією одного з факторів зовнішнього середовища. Результат може бути в одиницях вимірювання, тобто загальна кількість мікроорганізмів, кількість утвореного токсину, або продуктів метаболізму [22, 156, 168, 176, 468].

Вторинні моделі відображають зміни одного або кількох параметрів первинної моделі, пов'язані з дією одного чи кількох параметрів довкілля або умов культивування. Наприклад, які зміни мікроорганізмів відбуваються під час lag-фази, пов'язані з дією різних температурних режимів, різних параметрів рН-середовища чи активності води [432].

Третинні моделі – це використання однієї або кількох первинних та/або вторинних моделей одночасно. Як правило, це комп'ютерні програми чи бази даних [376–378, 468].

Принципи та методи прогнозуючої мікробіології застосовують, насамперед під час оцінці мікробіологічних показників як сировини, так і готової продукції, а також при контролі процесів виробництва (одержання сировини, виготовлення продукції; зберігання, консервування сировини чи продукції), під час оцінці мікробіологічного ризику харчових отруєнь та контролю за поширеністю патогенів (аналіз ризику) за системою НАССР, оскільки це пов'язано з безпекою продуктів харчування і здоров'ям споживачів [8, 12, 22, 156, 168, 176, 203]. На рисунку 4.2 показане використання прогнозуючої мікробіології. Прогнозуючу мікробіологію застосовують для вирішення важливих виробничих завдань, пов'язаних із попередженням мікробіологічних ризиків у харчових продуктах. Оцінка мікробіологічного ризику – це нова дисципліна у сфері безпеки продуктів харчування. Одним із труднощів, пов'язаних з оцінкою мікробіологічного ризику, є встановлення певного виду небезпечного мікроорганізму та його кількості на даний момент. Проте кількість небезпечних мікроорганізмів у продукті може змінюватися залежно від властивостей самого продукту (рН, вмісту води та солей) та параметрів його виготовлення й зберігання (температури, атмосфери, вологості,

присутність іншої мікрофлори). Принципи ж передбачуваної мікробіології використовують для оцінки змін щодо кількості певного виду небезпечного мікроорганізму з урахуванням вищенаведених параметрів [8, 12, 22, 156, 168, 176, 203].

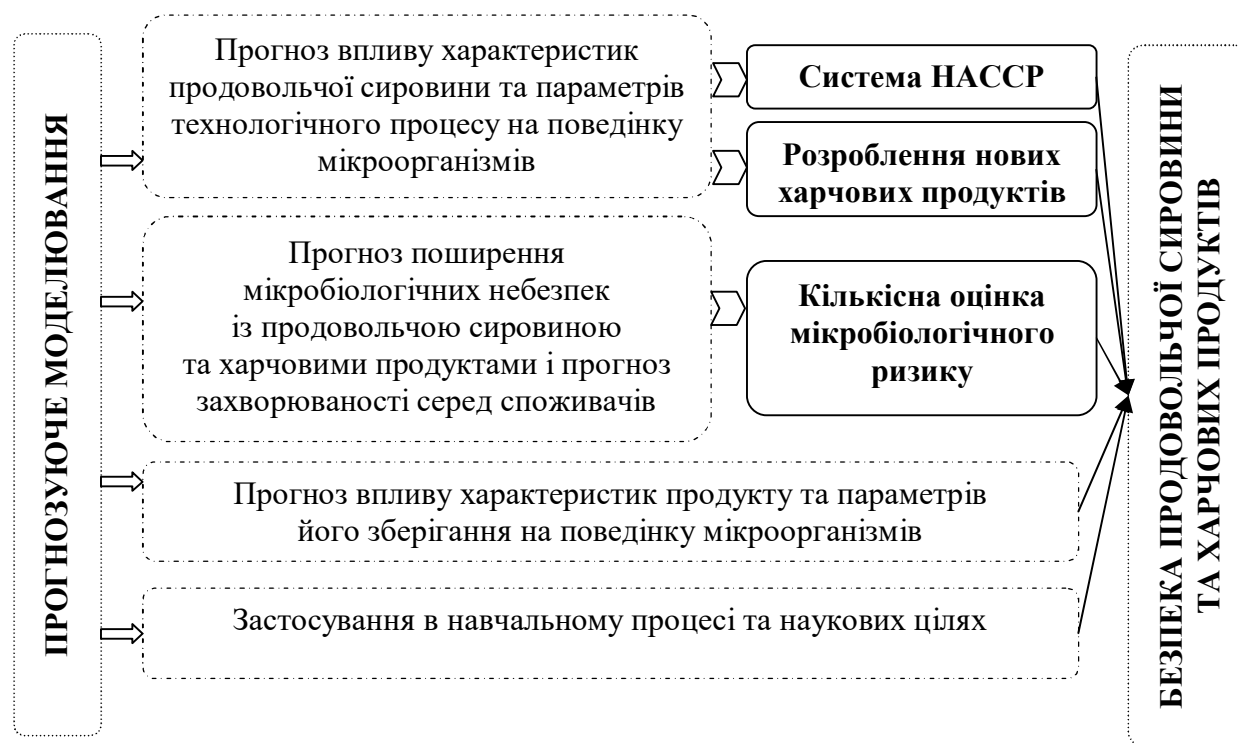


Рисунок 4.2 – Використання прогнозуючої мікробіології

Прогнозуюче моделювання як основа прогнозуючої, або предиктивної, мікробіології досить широко використовується науковцями, виробниками харчових продуктів, офіційними особами, які здійснюють державний нагляд та контроль у високорозвинених країнах світу, оскільки це сприяє ефективному контролю за мікробіологічними небезпеками на виробництві. Крім того, прогнозуюче моделювання є невід’ємною і важливою складовою під час аналізування мікробіологічних ризиків та в системі НАССР, а також при впровадженні нових технологій виробництва харчових продуктів.

Оцінка експозиції (впливу) бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) в сирому молоці корів на потенційну можливість контамінації ними молокопродуктів. Оцінка експозиції (впливу) бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) як одного зі складників оцінки мікробіологічного ризику ми досліджували шляхом вивчення впливу різних хімічних показників сирого

молока на ступінь розвитку цих мікроорганізмів. Одержання результатів таких досліджень сприятиме розробленню засобів управління кількісними показниками оцінки ризику від бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* в сирому молоці корів для мінімізації ризику щодо можливості контамінації ними молокопродуктів.

Одним із засобів управління мікробіологічними показниками досліджуваної продукції є попередження росту та розмноження мікроорганізмів. Бактерії *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* – маловивчений мікроорганізм, і ми не знайшли даних щодо вивчення впливу на нього таких хімічних показників сирого молока, як уміст жиру, білка й кислотність.

Вивчення впливу кожного з досліджуваних хімічних показників сирого молока корів на ріст та розмноження бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* вивчали в динаміці за умови охолодження впродовж 48 годин.

Результати зазначених досліджень наведені в нижченаданих трьох підрозділах, у кожному з яких проведено вивчення впливу на бактерії *E. sakazakii* окремого компонента сирого молока впродовж охолодження.

Вивчення впливу хімічного складу молока на динаміку кількості бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*.

Вивчення впливу вмісту жиру в молоці на динаміку кількості бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*. У даному підрозділі ми вивчали вплив вмісту жиру молока на динаміку кількості бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* під час зберігання його охолодженим. У дослідженнях використовували проби сирого молока з умістом жиру 4,5; 4,0; 3,6 та 3,2 %.

Результати проведених досліджень наведено на рис. 4.3 – 4.6.

Як бачимо з діаграми, наведеної на рис. 4.3, вміст молочного жиру в пробах молока при їх зберіганні впродовж 48 годин за температури 4 °C істотно впливає на кількість бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*.

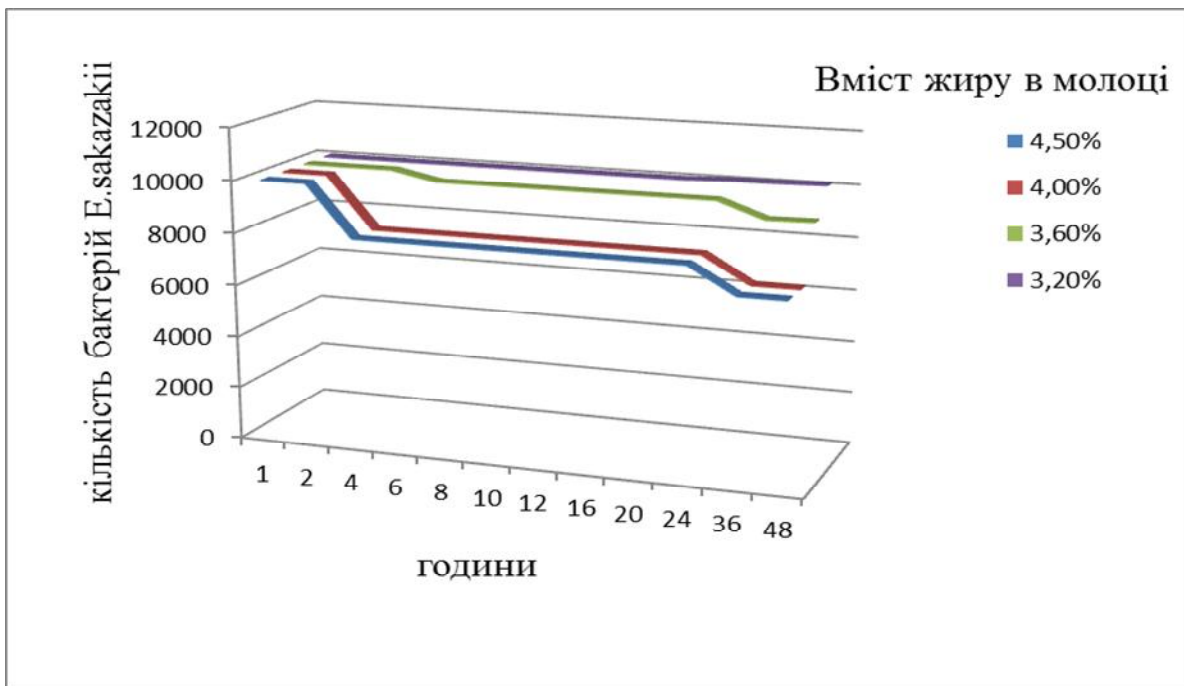


Рисунок 4.3 – Вплив вмісту жиру в молоці на динаміку кількості бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* при зберіганні його за температури 4 °С

Так, у пробах молока, де вміст жиру в молоці становив 4,5 та 4 %, кількість бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* значно зменшувалася впродовж терміну зберігання і наприкінці (36–48 годин) становила близько 7 тис. КУО/см³. У пробах молока, де вміст жиру був меншим – 3,2 %, кількість бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* впродовж терміну зберігання залишалась незмінною. При вмісті жиру в молоці 3,6 % зменшення кількості бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* було менш інтенсивним, ніж при більш високих його кількостях.

Різниця в кількості мікроорганізмів від початку експерименту полягала в тенденції динаміки цього показника до зменшення незалежно від вмісту жиру в досліджуваних пробах молока. Так, різниця щодо кількості бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* при вмісті жиру 4,5 та 3,6 % була в межах 2 300 КУО/см³.

Тобто високий вміст жиру в молоці за умов його охолодження до температури 4 °С і зберігання 48 годин є пригнічувальним чинником для росту

й розвитку бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* та свідчить про низьку ліполітичну активність мікроорганізму.

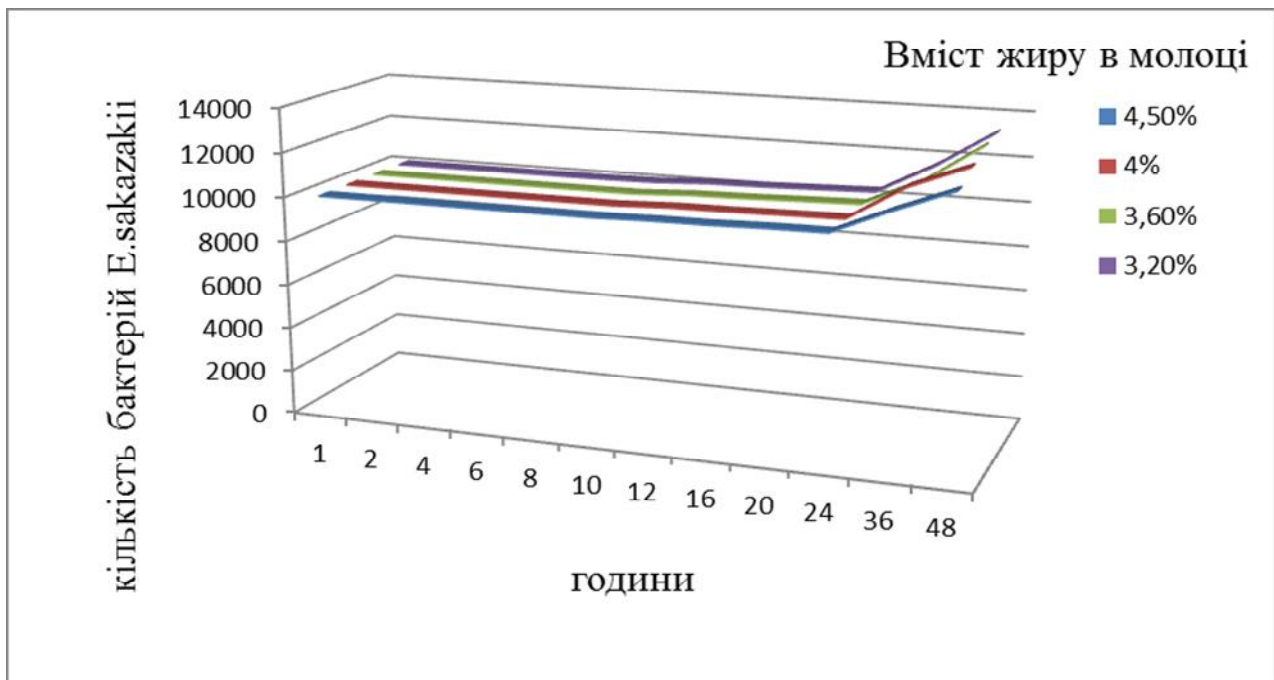


Рисунок 4.4 – Вплив умісту жиру в молоці на динаміку кількості бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* при зберіганні його за температури 6 °C

Як свідчать дані, проілюстровані діаграмою на рис. 4.4, вміст молочного жиру в пробах молока не впливав на кількість бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* впродовж 24 годин його зберігання за температури 6 °C, яка була в межах 9–10 тис. КУО/см³. Після 24 годин зберігання за цієї самої температури в усіх пробах молока відзначали збільшення кількості бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* незалежно від умісту жиру в них до максимальної кількості 14 тис. КУО/см³.

Ми також вивчали поведінку бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* в молоці за температури зберігання його 8 °C (рис. 4.5). Було встановлено, що за температури 8 °C підвищення кількості бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* спостерігалось вже на 12-ту годину його зберігання охолодженим у пробах молока з вмістом жиру 3,2 %. Для порівняння: в пробах молока з вмістом жиру 3,6 та 4 % збільшення кількості бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*

спостерігалось на 16-ту годину. В пробах молока, де вміст жиру становив 4,5 %, кількість бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* починала збільшуватися лише на 20-ту годину від початку експерименту.

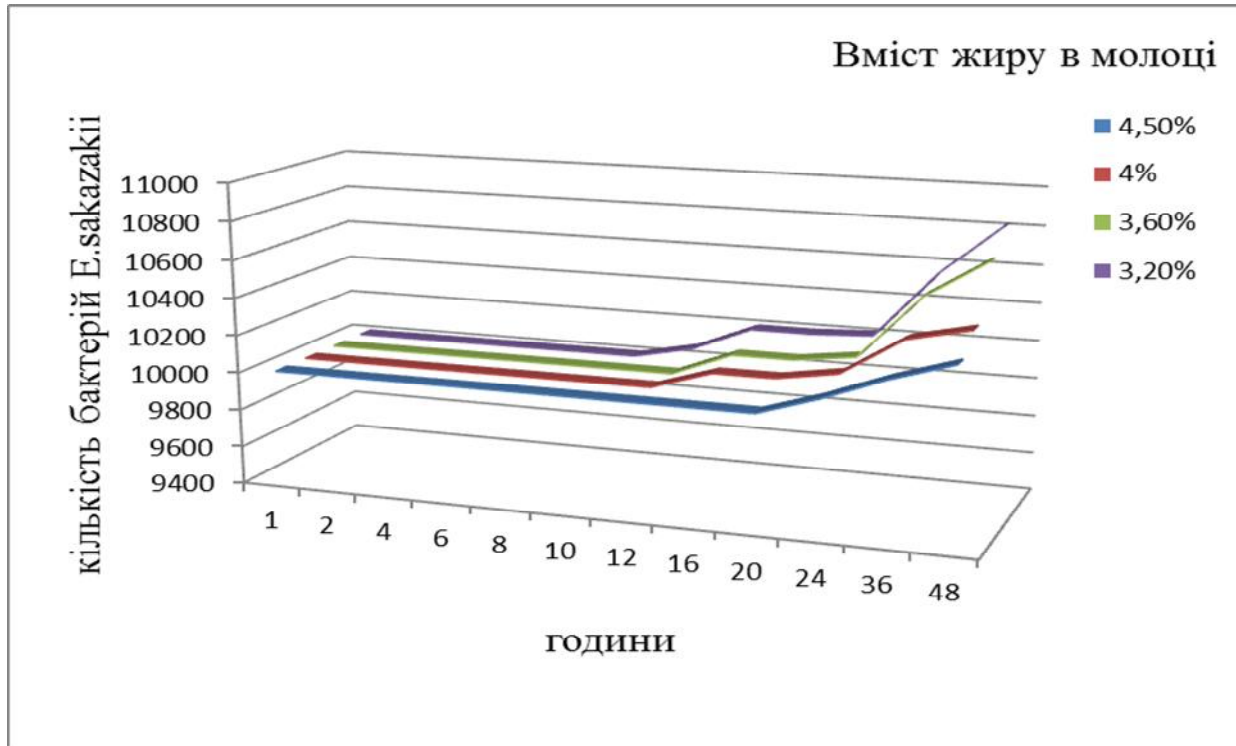


Рисунок 4.5 – Вплив вмісту жиру в молоці на динаміку кількості бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* при зберіганні його за температури 8 °C

У четвертому досліді за температури зберігання молока 10 °C в усіх пробах незалежно від умісту жиру зазначали підвищення кількості бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*. Як бачимо з діаграми рис. 4.6, вміст молочного жиру в пробах молока істотно не впливає на кількість бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*, і на 10-ту годину їх зберігання за температури 10 °C відзначається зростання кількості бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* з вихідної їх кількості 10 до 15 тис. КУО/см³. Із часом кількість бактерій у цих пробах ще збільшувалася на 2 тис. КУО/см³.

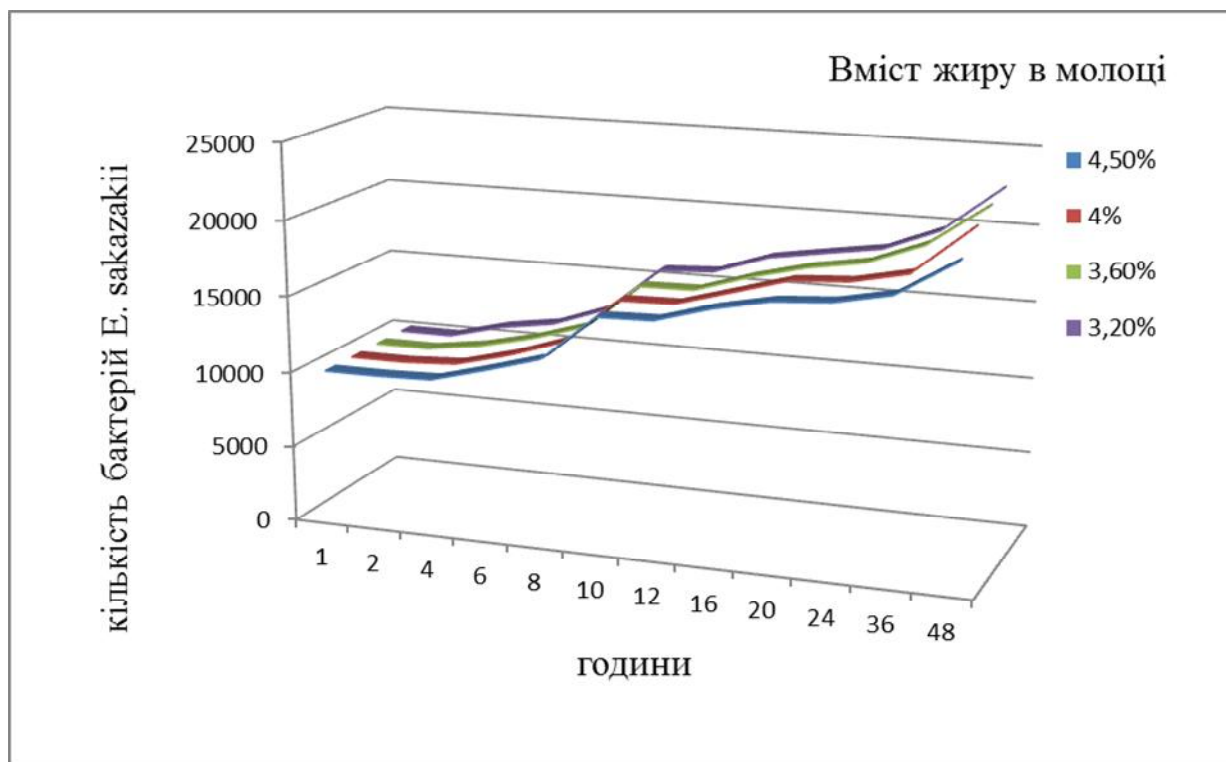


Рисунок 4.6 – Вплив вмісту жиру в молоці на динаміку кількості бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) при зберіганні його за температури 10 °С

Отже, за результатами проведених досліджень встановлено, що вміст жиру в молоці впливає на динаміку кількості бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) під час його зберігання охолодженим. Ріст та розмноження бактерій ефективно стримуються за умови зберігання молока за температури 4 °С та вмісту жиру в молоці 4,5 та 4 %. За цієї температури зберігання та підвищеного вмісту жиру в молоці відзначається зменшення динаміки росту мікроорганізмів даного виду.

Установлено, що за однакового початкового рівня бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) в змодельованих для досліджень пробах молока збільшення їх кількості було обернено пропорційним величині температури зберігання. Так, за низької температури зберігання проб молока (4 °С) найбільше середнє значення кількості бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) було в межах від 9 до 10 тис. КУО/см³, а за температури 10 °С – від 10 до 17 тис. КУО/см³.

Вивчення впливу вмісту білка в молоці на динаміку кількості бактерій *Enterobacter sakazakii*. У цьому підрозділі наведені результати впливу різного вмісту білка молока на динаміку кількості бактерій *Enterobacter sakazakii* при зберіганні його охолодженим (рис. 4.7–4.10).

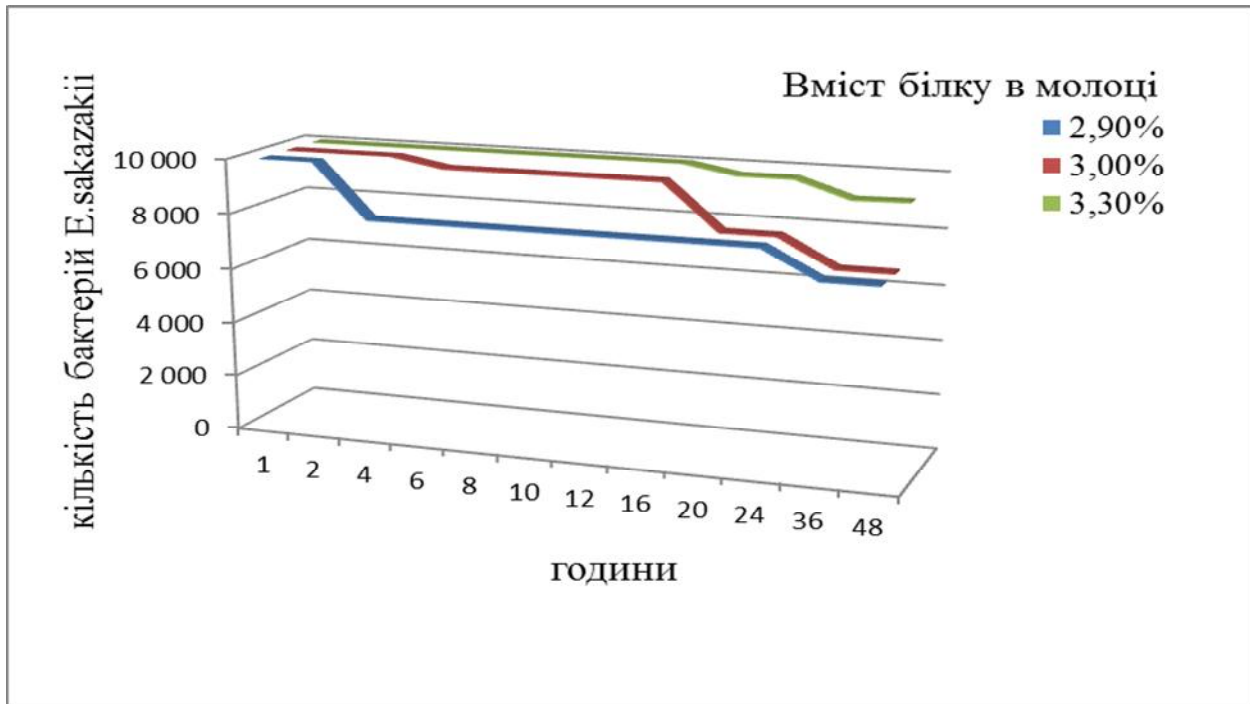


Рисунок 4.7 – Вплив вмісту білка молока на динаміку кількості бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) при зберіганні його за температури 4 °C

Як бачимо з діаграми рис. 4.7, вміст білка в пробах молока при довготривалому їх зберіганні за температури 4 °C істотно впливає на кількість бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*). Так, у пробах молока, де вміст білка становив 2,9 %, кількість бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) значно зменшувалася протягом терміну зберігання і наприкінці (36–48 годин) становила близько 7 тис. КУО/см³. У пробах молока, де вміст білка був 3,0 %, спостерігалось поступове зниження кількості бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*). Незначне зменшення кількості бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) спостерігали при зберіганні проб молока з умістом жиру 3,3 %: з 10 тис. КУО/см³ вихідної кількості бактерій до близько 9 тис. КУО/см³ у кінці дослідження.

Тобто високий вміст білка в молоці (3,3 %) за умов його зберігання охолодженим за температури 4 °С істотно не впливає на бактерії *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*, а вмісту 2,9 та 3,0 % білка в молоці виявляє пригнічувальну дію на ріст і розвиток мікроорганізмів.

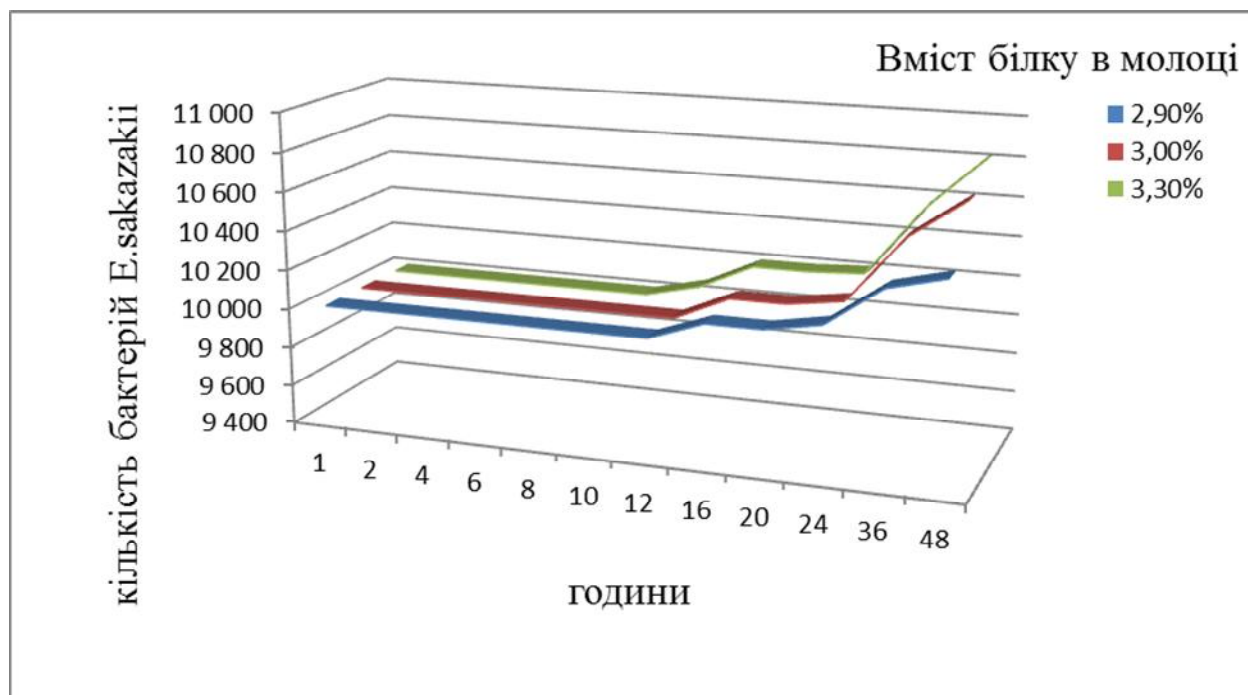


Рисунок 4.8 – Вплив вмісту білка молока на динаміку кількості бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* при зберіганні його за температури 6 °С

Як бачимо з діаграми рис. 4.8, не залежно від умісту білка в молоці при зберіганні його за температури 6 °С впродовж 48 годин відзначається збільшення кількості бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*. Із 16-ї години охолодження в усіх дослідних пробах молока спостерігали поступове збільшення кількості бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* з 10 до 10,5 тис. КУО/см³ у пробах молока з умістом білка 2,9 % та до 10,8 тис. КУО/см³ у пробах молока з умістом білка 3,3 %.

Тобто високий вміст білка в молоці (3,3 %) за умов його зберігання охолодженим за температури 6 °С сприяє незначному розвитку бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*.

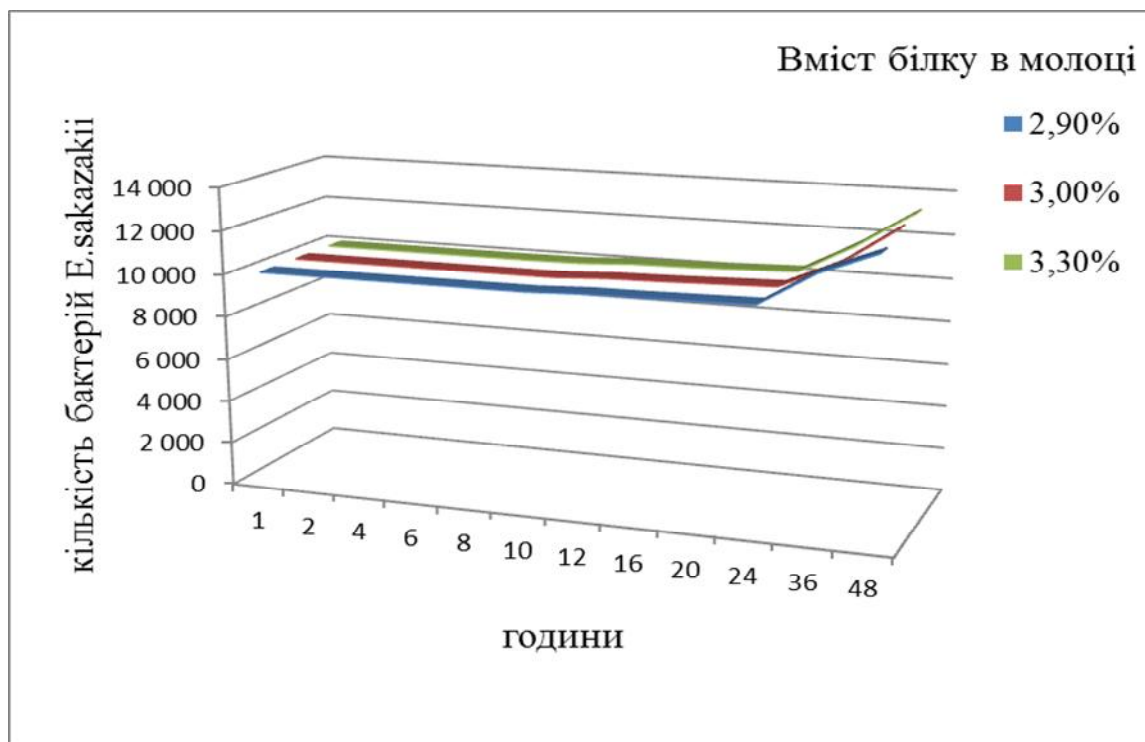


Рисунок 4.9 – Вплив вмісту білка молока на динаміку кількості бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* при зберіганні його за температури 8 °С

На діаграмі, наведеній на рис. 4.9, подані результати вивчення впливу різного вмісту білка в молоці на динаміку кількості бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* під час їх зберіганні за температури 8 °С.

З рисунка 4.9 бачимо, що кількість бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* в перші 20 годин зберігання поступово зростає в усіх пробах молока. А на 24-ту годину відзначається їх різке збільшення до 12,7 тис. КУО/см³ у пробах молока з вмістом білка 2,9 % та до 13,2 тис. КУО/см³ – у пробах молока з умістом білка 3,3 %.

Як бачимо з діаграми рис. 4.10, незалежно від умісту білка в молоці при зберіганні його впродовж 48 годин за температури 10 °С відзначається значне збільшення кількості бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* від 10 до 20,5 тис. КУО/см³ у пробах молока з умістом білка 2,9 % та до 22,5 тис. КУО/см³ у пробах молока з умістом білка 3,3 %.

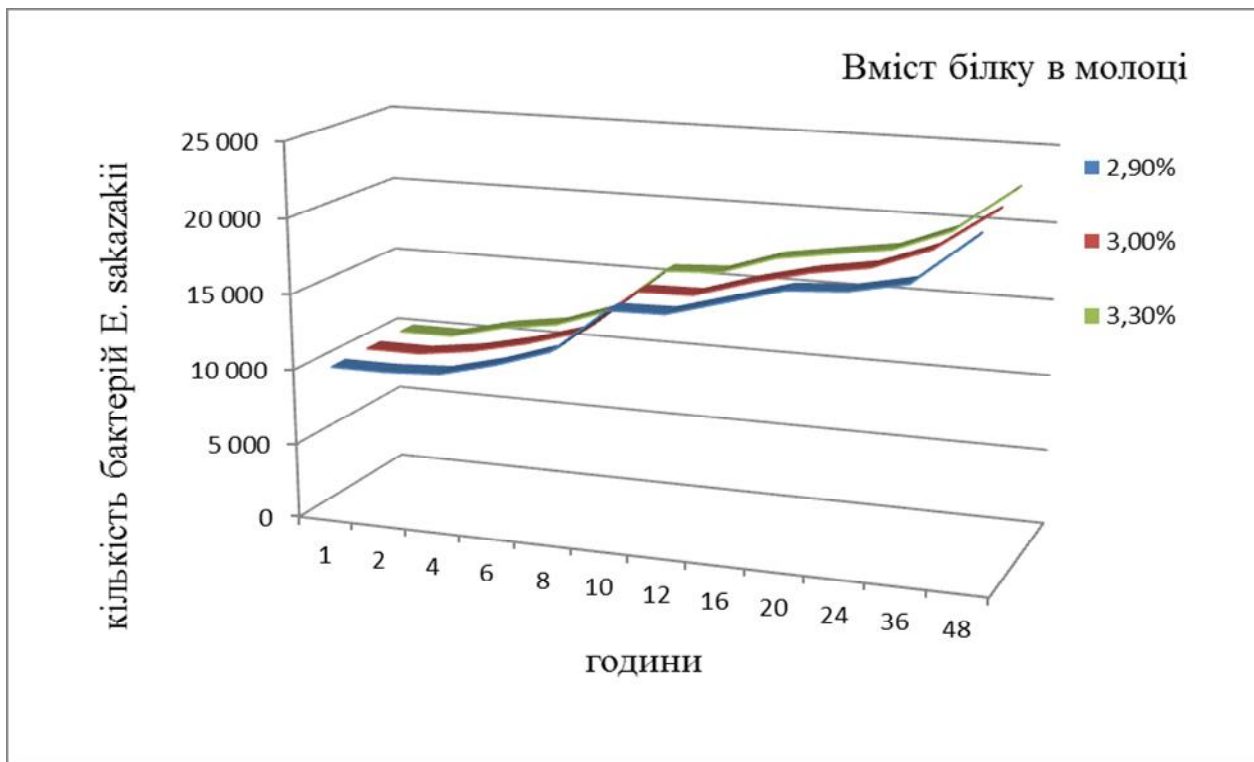


Рисунок 4.10 – Вплив вмісту білка молока на динаміку кількості бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) при зберіганні його за температури 10 °С

Отже, кількість бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) в пробах із різним умістом білка в молоці (від 2,9 до 3,3 %) і за умов його зберігання за температури 10 °С зростає майже удвічі.

Вивчення впливу кислотності молока на динаміку кількості бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*). У цьому підрозділі ми наводимо результати вивчення впливу кислотності молока на динаміку кількості бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) при зберіганні його охолодженим.

Результати проведених досліджень наведено на рис. 4.11–4.14.

Результати досліджень, подані на діаграмі рис. 4.11, свідчать про те, що при зберіганні молока за температури 4 °С впродовження 48 годин істотних змін щодо кількості бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) не відзначено за його кислотності 16 та 17 °Т. І через 24 години їх кількість становила 10,1 тис. КУО/см³. За підвищеної кислотності молока 19 і 20 °Т кількість

бактерій *Enterobacter sakazakii* вже помітно знижувалося на 4-ту годину зберігання і становила 8 тис. КУО/см³.

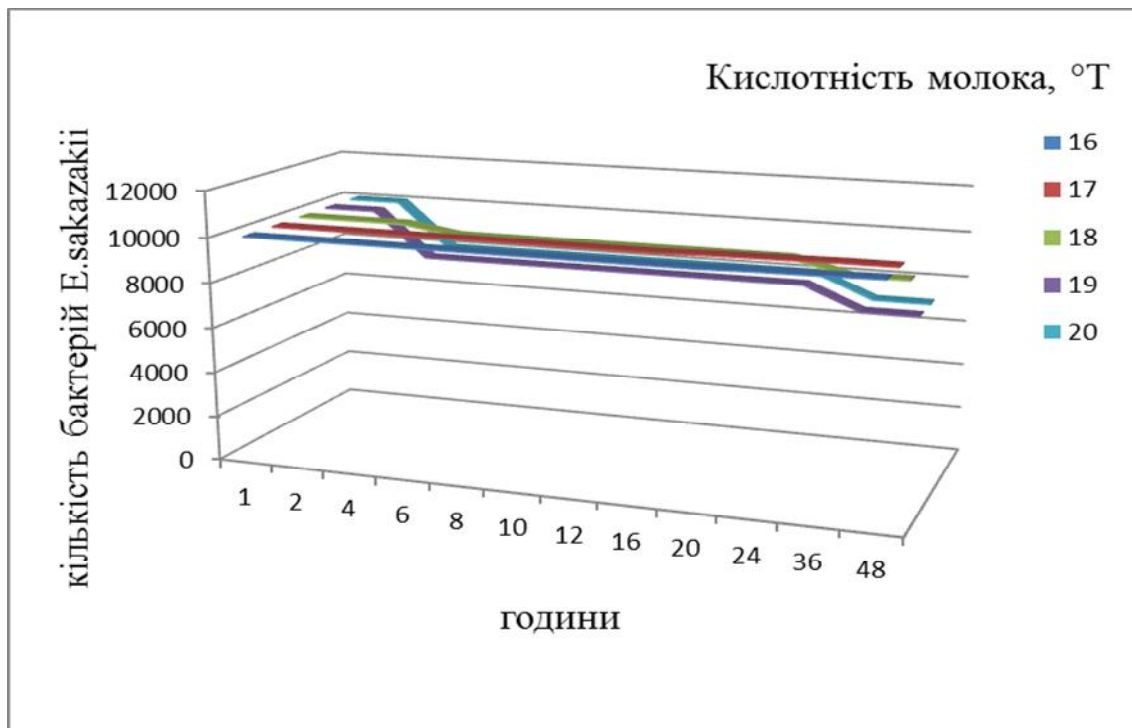


Рисунок 4.11 – Вплив кислотності молока на динаміку кількості бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* при зберіганні його за температури 4 °С

Як бачимо з діаграми рис. 4.12, під час зберігання молока за температури 6 °С в перші 12 годин змін щодо кількості бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* не відзначено при всіх показниках кислотності, вона становила 10 тис. КУО/см³. Із 16-ї до 48-ї години в усіх пробах молока відзначалося збільшення кількості бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* майже в 1,5 раза.

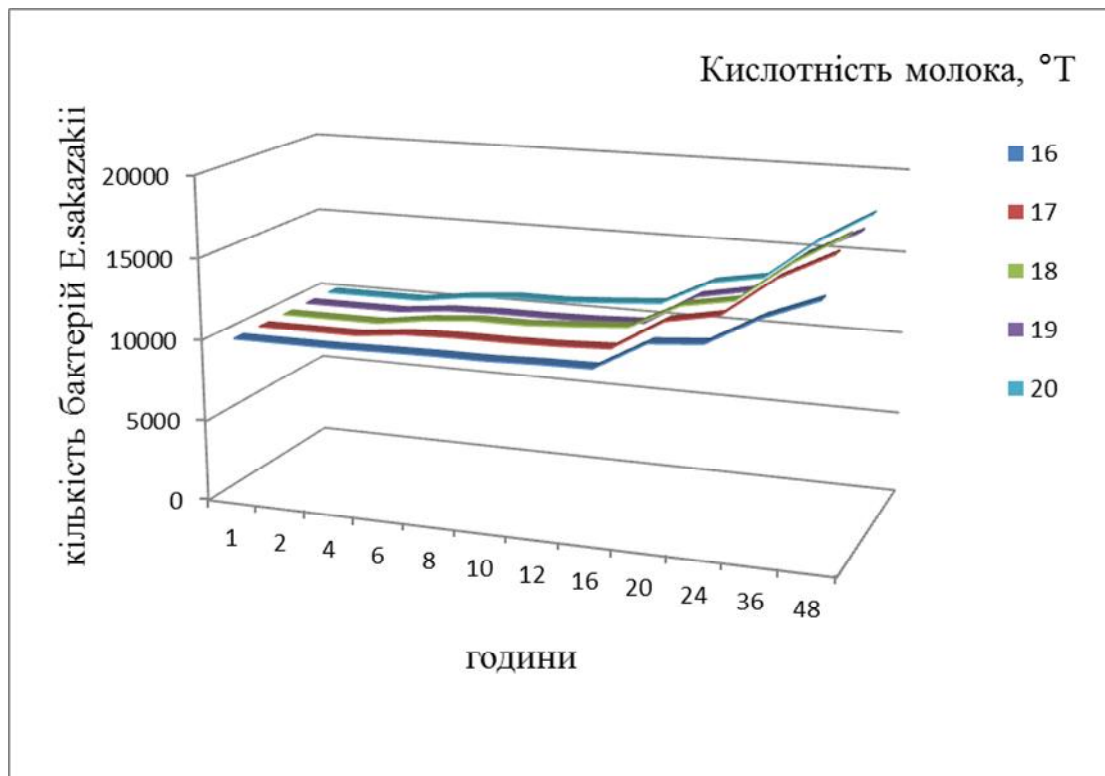


Рисунок 4.12 – Вплив кислотності молока на динаміку бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* при зберіганні його за температури 6 °C

Як бачимо з діаграми рис. 4.13, при довготривалому зберіганні проб молока за температури 8 °C у перші 10 годин змін у кількості бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* не відзначено при всіх показниках кислотності і становить 10 тис. КУО/см³. На 12-ту годину в молоці з кислотністю 17, 18, 19, 20 відзначається збільшення кількості бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*.

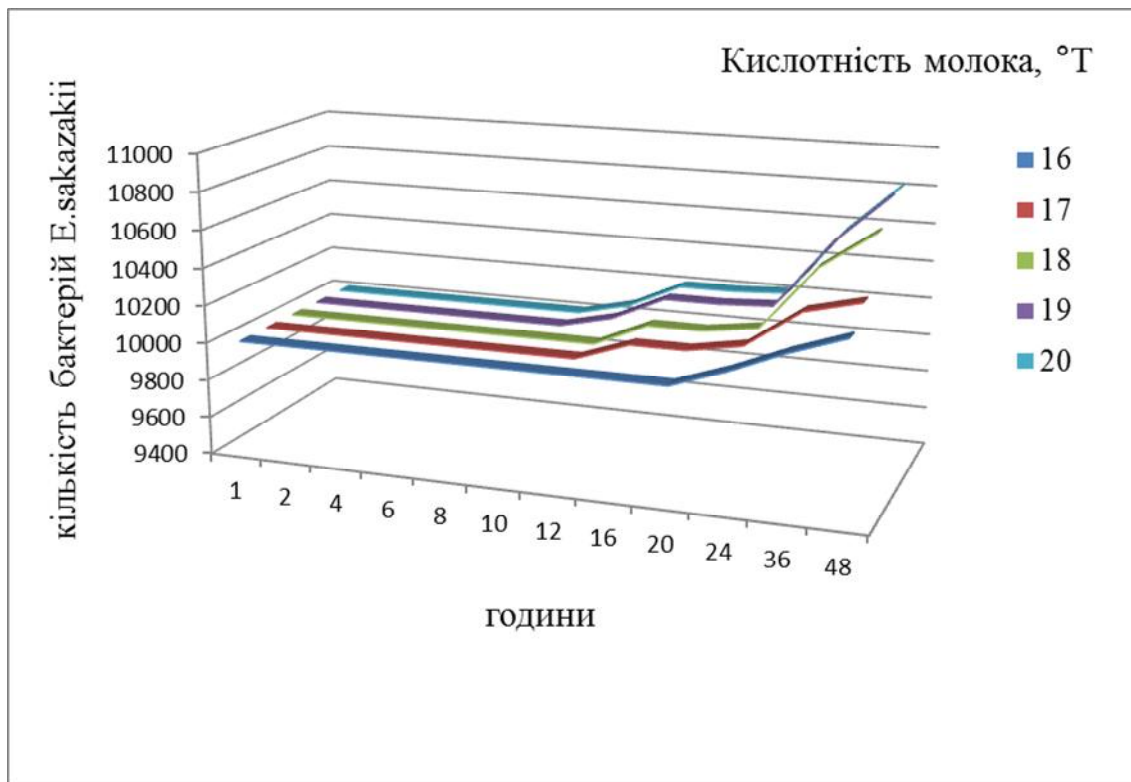


Рисунок 4.13 – Вплив кислотності молока на динаміку кількості бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) при зберіганні його за температури 8 °C

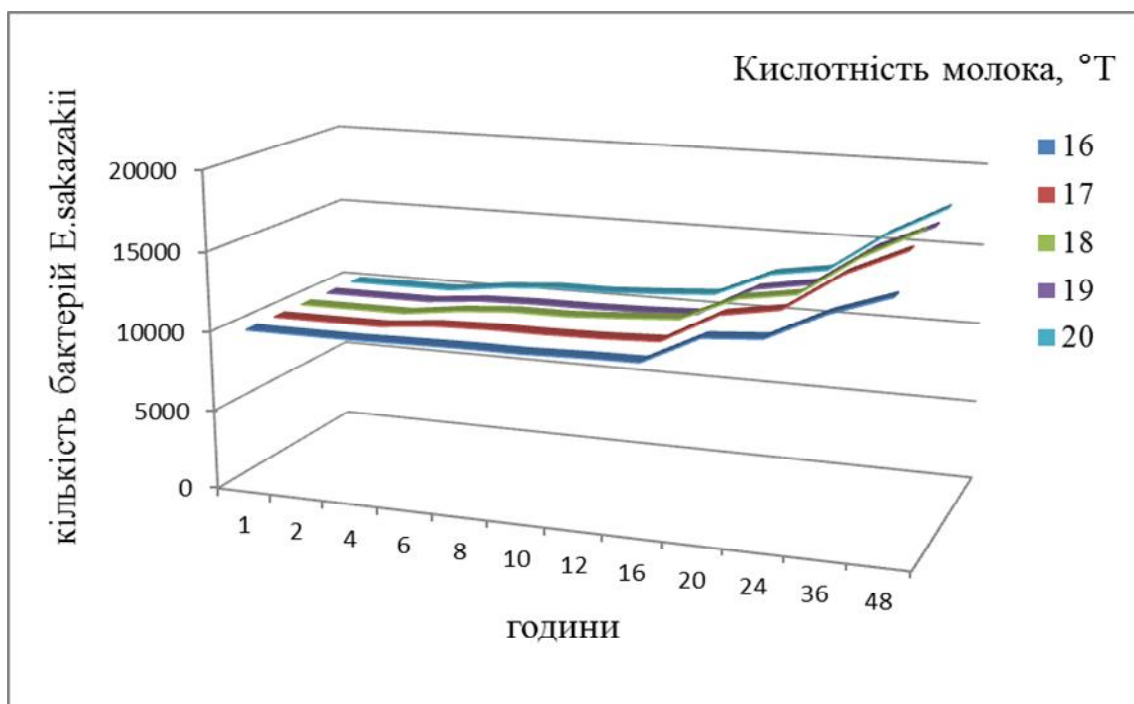


Рисунок 4.14 – Вплив кислотності молока на динаміку кількості бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) при зберіганні його за температури 10 °C

Як бачимо з діаграми на рис. 4.14, при зберіганні проб молока з різною кислотністю за температури 10 °С кількість бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* збільшується майже в 1,5 раза.

Унаслідок проведених досліджень було встановлено, що вміст жиру в молоці має інгібуючий вплив на розвиток бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* лише концентрацією 4,5 % за температури зберігання охолодженим молоком до 4 °С. В решті випадків вміст жиру не мав істотного впливу на динаміку кількості бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* в молоці.

Вміст білка в молоці стимулює розвиток бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* при зберіганні його охолодженим, особливо за температури 6–8 °С. При зберіганні проб молока за температури 4 °С кількість бактерій довготривалий час залишалася незмінною (вміст білка 3,3 %) або знижувалася незначно (вміст білка 3,0 %).

Кислотність молока, як і вміст молочного жиру, негативно впливає на бактерії *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* за низьких температур (4 °С), а при підвищенні температури зберігання навпаки сприяє розвитку цих мікроорганізмів.

Вищезазначені дослідження доповнили характеристику бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* стосовно їх поведінки в молоці з різним фізико-хімічним складом. Формування різних фізико-хімічних властивостей молока в моделях дослідів дозволило нам дослідити рівні кількісного складу бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* за дії таких чинників, як жир, білок та кислотність. За результатами досліджень встановлено, що бактерії в молоці за умов зберігання охолодженим більш інтенсивно розвиваються за температури 8 °С та 10 °С, при вмісті жиру 3,6 %, білка – 3,3 % та кислотності 16–17 °Т вже через 12–16 годин.

Несприятливими умовами для росту і розмноження бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* виявлено: вміст жиру – 4,5 %, вміст білка – 2,9 %, кислотність – 19–20 °Т за температури охолодження 4 °С у перші 8–10 годин зберігання.

Одержані в цьому розділі результати досліджень були підґрунтям для проведення подальших досліджень стосовно розроблення способу прогнозування кількості бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* у збірному молоці корів упродовж терміну зберігання його охолодженим. Результати подані в наступному розділі.

Використання нейронних мереж для прогнозування росту та розмноження мікроорганізмів у харчових продуктах

Останнім часом спостерігається підвищена тенденція проведення наукових досліджень із застосуванням штучного інтелекту, а саме моделювання та прогнозування за допомогою комп'ютера і зокрема штучних нейронних мереж. На сьогодні цей підхід широко використовується в економіці, політиці, медицині, техніці, харчовій промисловості, екології та інших біологічних науках [5, 3–6, 7, 56, 59, 71, 80, 148, 171, 172, 198].

Уперше теорія нейронних мереж як науковий напрямок був зазначений у працях Мак-Каллока та Піттса в 1943 році, в яких зазначалося, що будь-яку арифметичну або логічну функцію можна реалізувати за допомогою простої нейронної мережі. Серед базових стосовно нейронних мереж необхідно зазначити працю Д. Хебба, яка є стартовою для алгоритмів навчання нейронних мереж. Проте, починаючи з 1968 до 1985 років, нейронні мережі майже не використовувалися, а в період 1985–1986 років цей напрям «технологічний імпульс» був викликаний можливістю застосування нейронних мереж на доступних на той час персональних комп'ютерах [41].

Настільною книгою спеціаліста, який моделює з використанням нейронних мереж, стала праця Ф. Уоссермена «Нейрокомпьютерная техника», видана російською мовою в 1992 році. Останніми роками, за оцінками спеціалістів, відзначається значне технологічне зростання у використанні нейронних мереж у різних галузях діяльності людини. Нейронні мережі продемонстрували свою здатність вирішувати складні завдання, серед яких класифікація, прогноз, прийняття рішень, управління інформацією та її кодування тощо [2, 5, 7, 56, 3–6, 59, 71, 80, 148, 171, 172, 198].

Штучні нейронні мережі – це математичні моделі, а також їх програмні реалізації, побудовані на принципі організації та функціонування біологічних нейронних мереж – сплетень нервових клітин живого організму. Штучні нейронні мережі – це система (пристрій) для опрацювання даних, що складається з набору паралельно працюючих простих процесорних елементів – нейронів, зв'язаних між собою лініями передавання даних – синапсами.

У нейронній мережі нейрони розміщуються в кількох окремо розташованих рівнях. При цьому до нейронів першого рівня надходять дані, які після перетворення передаються до нейронів другого, там, у свою чергу, утворюються дані, що надходять до нейронів наступних рівнів. Процес продовжується до того часу, поки від нейронів останнього рівня не буде отримано вихідний сигнал із даними про спрогнозований результат. Здатність штучних нейронних мереж до прогнозування – це її здатність до узагальнення та виявлення невидимих залежностей між вхідними та вихідними даними. Після навчання штучні нейронні мережі здатні спрогнозувати дані певної послідовності на підставі декількох попередніх значень або факторів.

Застосування штучних нейронних мереж для прогнозу динаміки кількості мікроорганізмів у продуктах харчування залежно від їх складу ми знайшли в ряді праць [4, 12, 13, 165, 168, 176, 177, 295]. За даними M. N. Hajmeeretal (1997, 1998, 2000), штучні нейронні мережі були використані для встановлення оптимальних параметрів (температура, рН, активність води та вміст NaCl і NaNO₂) для росту *S. cerevisiae*, *Shigella flexneri* та *E. coli* O157:H7 у харчових продуктах [287–291]. A. H. Geeraerd etal. (1998) застосовували нейронні мережі для прогнозу росту мікроорганізмів в охолоджених продуктах харчування [272]. S. Jeyamkondanaetal. (2001) використали штучні нейронні мережі для моделювання затримки росту *Aeromonas hydrophilia*, *S. flexneri* та *Brochothrix thermosphacta* на дію різних температур, рН та вмісту солі [316].

Розроблення, встановлення ефективності та апробація методу прогнозування кількості бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* в молоці за різних хімічних параметрів та впродовж зберігання його охолодженим із

використанням комп'ютерної нейромережевої програми «NeuroPro», версія 0,25.

Розроблення методу прогнозування кількості бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* з використанням комп'ютерної нейромережевої програми «NeuroPro», версія 0,25. Із попереднього підрозділу результатів власних досліджень бачимо, що ріст та розмноження бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* залежать від багатьох чинників. Впливати на ці чинники та контролювати процес розмноження бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* в сирому молоці впродовж охолодження можна лише за умови проведення багатофакторного аналізу, який за звичайних умов дуже складний та довготривалий.

Підтвердженням цього можуть бути чисельні експериментальні данні, які ми одержали. Щоб проаналізувати ці дані та сформулювати висновки щодо конкретних результатів взаємодії певних чинників, необхідно затратити багато часу. Але для того, щоб належним чином здійснювати контроль за такими небезпечними мікроорганізмами, як бактерії *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* необхідно відстежувати їх кількість у динаміці за різних умов виробництва молока, що сприятиме розробленню та запровадженню ефективних засобів попередження ризику, що може виникати від цього мікроорганізму.

Для підвищення ефективності контролю за кількістю бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* в сирому молоці корів за різних умов його зберігання з урахуванням фізико-хімічних показників, необхідно використовувати можливості сучасних методів комп'ютерного оброблення даних. Такий контроль можна провести за умов введення конкретних сформованих моделей, які складаються з комплексу параметрів фізико-хімічних показників молока та умов його зберігання в спеціальні комп'ютерні програми на підставі багатофакторного аналізу.

Аналіз із комп'ютерним обробленням взаємозв'язків між різними параметрами дає можливість прогнозувати розвиток за конкретних умов.

Прогнозування росту та розмноження бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* в сирому молоці корів є дуже важливим як для виробників молока, так і для здійснення офіційного ветеринарного контролю.

Для прогнозування кількості бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* в молоці ми використали комп'ютерну програму «NeuroPro», версія 0,25, принцип роботи якої базується на штучній нейронній мережі, а основні характеристики та моменти роботи з нею викладені в її довідковому пакеті і частково подані в розділі «Матеріали і методи досліджень». Схематично принцип роботи комп'ютерної нейромережевої програми «NeuroPro», версія 0,25, яку ми використали для розроблення методу прогнозування кількості бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* в молоці за різних його фізико-хімічних показників, подана на рис. 4.15.

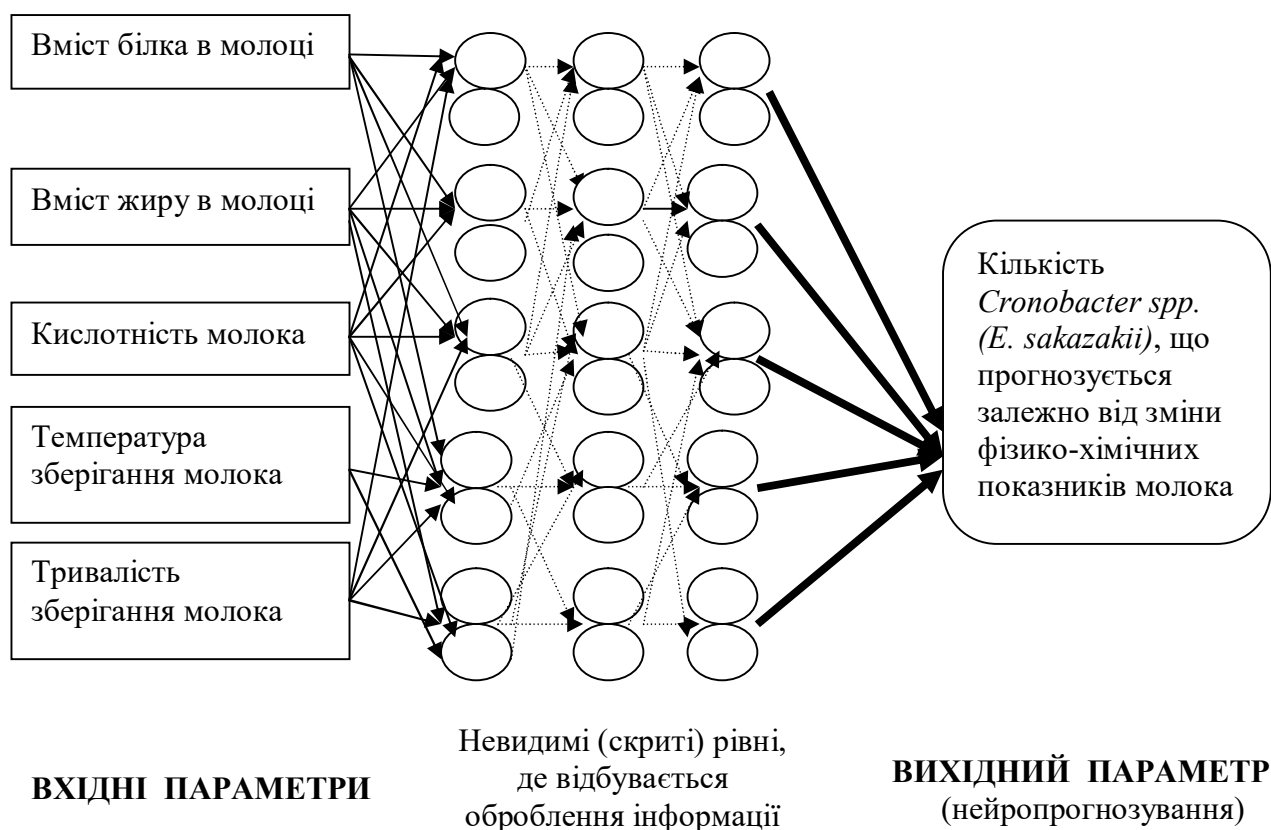


Рисунок 4.15 – Схематичне зображення принципу роботи комп'ютерної нейромережевої програми «NeuroPro», версія 0,25, для прогнозування кількості бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* в молоці

На підставі базової нейронної мережі ми розробили власну нейронну мережу, шляхом внесення вхідних параметрів, отримані експериментально. Отже, новостворена штучна мережа мала 5 вхідних параметрів, один вихідний параметр та 3 невидимі рівні по 10 нейронів у кожному.

Метод прогнозування був розроблений п'ятьма етапами:

I етап. Формування бази даних із результатів власних експериментальних досліджень (формат dbf):

а) результати вивчення впливу вмісту білка в молоці на кількість бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* в ньому впродовж терміну зберігання 48 год;

б) результати вивчення впливу вмісту жиру в молоці на кількість бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* в ньому впродовж терміну зберігання 48 год;

в) результати вивчення впливу кислотності молока на кількість бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* в ньому впродовж терміну зберігання 48 год.

II етап. Створення нейропроекту.

III етап. Навчання штучної нейронної мережі та її тестування.

IV етап. Визначення та збереження показників значущості вхідних сигналів та спрощення штучної нейронної мережі (зменшення кількості найменш значущих сигналів).

V етап. Одержання статистичної інформації та оцінювали прогнозуючу здатність щодо достовірності прогнозування кількості бактерій *Enterobacter sakazakii* в сирому охолодженому молоці впродовж зберігання.

Алгоритм дій, який використовували під час розроблення методу прогнозування кількості *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* в молоці на підставі нейромережевої програми, наведено на рис. 4.15.

Оскільки програма адаптована російською мовою, то на рис. 4.16 наведено алгоритм дій під час розроблення методу мовою оригіналу.

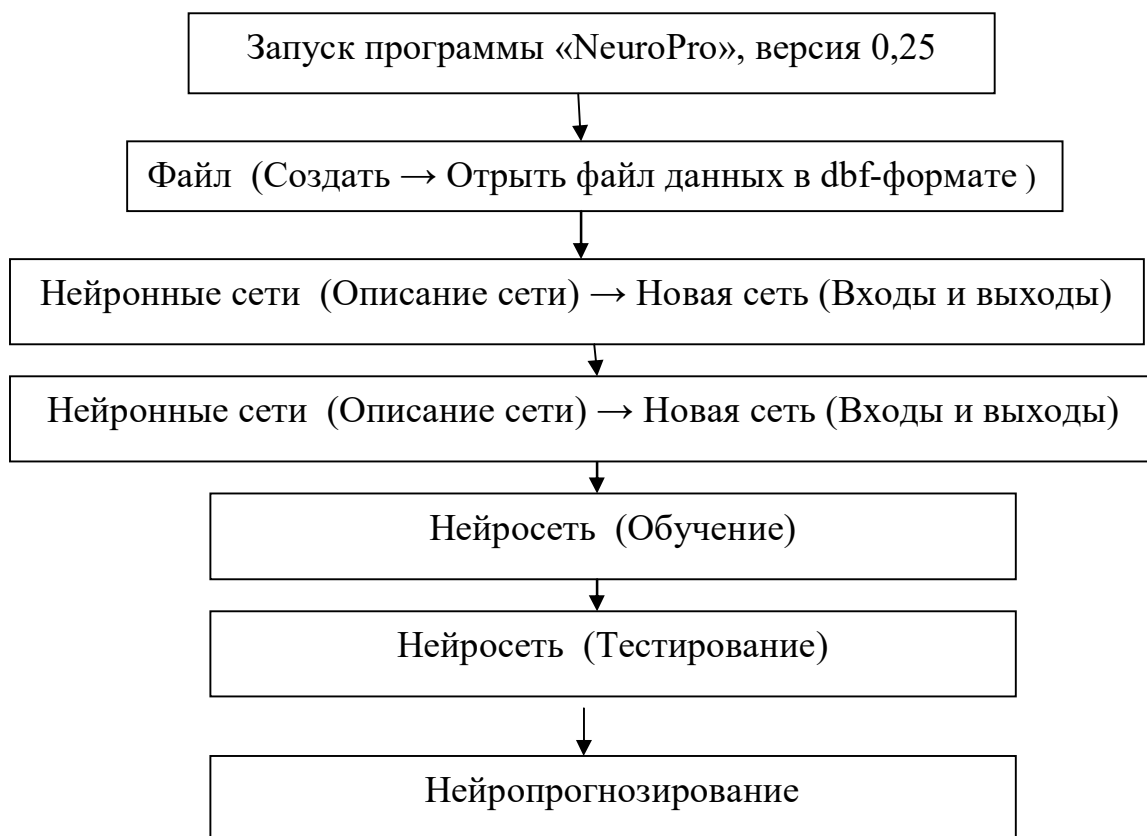


Рисунок 4.16 – Алгоритм дій під час розроблення методу прогнозування кількості *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* в молоці з використанням комп’ютерної нейромережевої програми «NeuroPro», версія 0,25

Метод прогнозування кількості бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*, який ми розробили, – це використання комп’ютерної нейромережевої програми «NeuroPro», версія 0,25, із базою наших експериментальних даних стосовно взаємозалежностей між фізико-хімічними параметрами сирого молока, умовами його зберігання та кількістю бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*.

Використання методу здійснюють шляхом установлення комп’ютерної нейромережевої програми «NeuroPro», версія 0,25, на персональному комп’ютері, за якою можна нейропрогнозувати кількість бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* в сирому молоці та навченої на експериментальних даних, які ми одержали.

Алгоритм дій використання розробленого, методу прогнозування кількості бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* в сирому молоці з

використанням комп'ютерної нейромережевої програми «NeuroPro», версія 0,25, наведено на рис. 4.17.



Рисунок 4.17 – Алгоритм дій при використанні методу прогнозування кількості *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* в молоці з використанням комп'ютерної нейромережевої програми «NeuroPro», версія 0,25

Використання запропонованого методу може використовуватися безпосередньо виробником сирого молока, на молокопереробному підприємстві під час зберігання сирого молока та для здійснення контролю за вмістом бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* офіційною службою ветеринарної медицини, а також науковцями та в навчальному процесі.

Установлення ефективності методу прогнозування кількості бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* в молоці коров'ячому збірному охолодженому з використанням штучних нейронних мереж упродовж його зберігання проводили шляхом порівняння експериментальних даних та даних, одержаних із використанням комп'ютерного прогнозування.

Нижче наведено результати встановлення ефективності та апробації власного методу прогнозування кількості бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* з використанням комп'ютерної нейромережевої програми «NeuroPro», версія 0,25.

Визначення ефективності методу прогнозування кількості бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* в молоці залежно від вмісту жиру в ньому та зберігання охолодженим із використанням комп'ютерної нейромережевої програми «NeuroPro», версія 0,25. На практиці існують різні умови зберігання зберігання сирого молока. Користуючись розробленим методом прогнозування кількості бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* в молоці, ми змоделювали ситуації різних хімічних параметрів молока, що впливають на ріст та розмноження вищезазначених мікроорганізмів.

Спочатку ми випробували метод прогнозування кількості бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* в молоці залежно від різної масової частки жиру в ньому. Для цього в комп'ютерну нейромережеву програму «NeuroPro», версія 0,25 ввели дані власних експериментальних досліджень.

Вхідними параметрами (сталі величини) при цьому були такі показники молока: титрована кислотність – 17 °Т, вміст білка 3,0 %, температура зберігання 4 °С та вихідна кількість бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* – 10 000 КУО/см³. Вхідним параметром, але змінною величиною, була масова частка жиру в молоці (4,5; 4,0; 3,6 %). Зміну кількості бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* визначали через 2, 10, 16 та 24 години зберігання його охолодженим. Вихідним параметром була спрогнозована кількість бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* в охолодженому молоці залежно від різної масової частки жиру в ньому (прогнозована величина).

Ефективність запропонованого методу визначали шляхом порівняння результатів власних експериментальних досліджень та нейропрогнозу, одержаного в результаті використання навченої нейромережевої програми «NeuroPro», версія 0,25. Результати досліджень наведені в табл. 4.1.

Таблиця 4.1 – Встановлення ефективності методу кількості бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* в молоці залежно від вмісту жиру в ньому та зберіганні охолодженим, із використанням комп'ютерної нейромережевої програми «NeuroPro», версія 0,25

Масова частка жиру в молоці, %	Час, год	Кількість бактерій <i>Cronobacter spp. (E. sakazakii)</i> , КУО/см ³		Ефективність методу (ступінь достовірності)	
		фактично	нейропрогнозування	відхилення	відсоток
4,5	2	10 000	9 232,94	767,06	7,67
4,0		10 000	8 921,91	1 078,09	10,78
3,6		10 000	9 232,94	767,06	7,67
4,5	10	9 000	8 129,35	870,65	8,7
4,0		9 000	8 129,35	870,65	8,7
3,6		9 000	8 129,35	870,65	8,7
4,5	16	8 000	7 919,47	80,53	0,81
4,0		8 000	7 699,19	300,81	3,0
3,6		8 000	7 919,47	80,53	0,81
4,5	24	8 000	7 721,91	278,09	2,78
4,0		8 000	7 721,91	278,09	2,78
3,6		8 000	7 721,91	278,09	2,78

Визначення ефективності методу прогнозування кількості бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* в молоці залежно від вмісту білка в ньому та зберіганні охолодженим із використанням комп'ютерної нейромережевої програми «NeuroPro», версія 0,25. Вхідними параметрами (сталі величини) при цьому були такі показники молока: титрована кислотність – 17 °Т, масова частка жиру – 4,5 %, температура зберігання – 4 °С та вихідна кількість

бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* – 10 000 КУО/см³. Вхідним параметром але перемінною величиною, була кількість білка в молоці (3,3; 3,0; 2,9 %). Зміну кількості бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* визначали через 2, 10, 16 та 24 години зберігання його охолодженим. Вихідним параметром була спрогнозована кількість бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* в охолоджену молоці залежно від різної кількості білка в ньому (прогнозована величина). Результати встановлення ефективності запропонованого методу наведені в табл. 4.2.

Таблиця 4.2 – Установлення ефективності методу прогнозування кількості бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* в молоці залежно від вмісту білка в ньому, з використанням комп'ютерної нейромережевої програми «NeuroPro», версія 0,25

Кількість білка, %	Час, год	Кількість бактерій <i>Cronobacter spp. (E. sakazakii)</i> , КУО/см ³		Ефективність методу (ступінь достовірності)	
		фактично	нейропрогнозування	відхилення	відсоток
3,3	2	10 000	9 232,94	767,06	7,67
3,0		10 000	9 232,94	767,06	7,67
2,9		10 000	9 232,94	767,06	7,67
3,3	10	9 000	8 129,35	870,65	8,7
3,0		9 000	8 129,35	870,65	8,7
2,9		9 000	8 129,35	870,65	8,7
3,3	16	8 000	7 919,47	80,53	0,81
3,0		8 000	7 919,47	80,53	0,81
2,9		8 000	7 919,47	80,53	0,81
3,3	24	8 000	7 721,91	278,09	2,78
3,0		8 000	7 721,91	278,09	2,78
2,9		8 000	7 721,91	278,09	2,78

Визначення ефективності методу прогнозування кількості бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* в молоці залежно від титрованої кислотності молока та при зберіганні охолодженим із використанням комп'ютерної нейромережевої програми «NeuroPro», версія 0,25. Вхідними параметрами (сталі величини) при цьому були такі показники молока: вміст білка – 3,0 %, масова частка жиру – 4,5 %, температура зберігання – 4 °С та вихідна кількість бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* – 10 000 КУО/см³. Вхідними параметрами, але змінними величинами, були різні значення титрованої кислотності молока (17, 18, 19 °Т). Зміну кількості бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* визначали через 2, 10, 16 та 24 години зберігання його охолодженим. Вихідним параметром була спрогнозована кількість бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* молоці охолодженому залежно від різної кількості білка в ньому (прогнозована величина).

Результати встановлення ефективності запропонованого методу наведені в табл. 4.3.

Таблиця 4.3 – Встановлення ефективності способу прогнозування кількості бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* в молоці залежно від титрованої кислотності молока та при зберіганні охолодженим, із використанням комп'ютерної нейромережевої програми «NeuroPro», версія 0,25

Кислотність, °Т	Час, год	Кількість бактерій <i>Cronobacter spp. (E. sakazakii)</i> , КУО/см ³		Ефективність методу (ступінь достовірності)	
		фактично	нейропрогнозування	відхилення	відсоток
17	2	10 000	9 232,90	767,1	7,67
18		10 000	9 104,40	895,6	8,96
19		9 500	8 969,40	530,6	5,31

Продовження таблиці 4.3

1	2	3	4	5	6
17	10	9 000	8 129,35	870,65	8,71
18		9 000	7 922,31	1077,69	12,3
19		8 000	7 725,67	274,33	2,74
17	16	8 000	7 919,47	80,53	0,81
18		8 000	7 699,19	300,81	3,0
19		7 000	7 492,95	-492,95	-
17	24	8 000	7 721,91	278,09	2,78
18		8 000	7 487,31	512,69	5,13
19		7 000	7 267,97	-267,97	-

Як бачимо з наведених результатів, запропонований метод прогнозування кількості бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* в молоці впродовж часу використання комп'ютерної нейромережевої програми «NeuroPro», версія 0,25, залежно від окремо взятих різних значень показників кислотності та вмісту жиру й білка в ньому має високий ступінь достовірності, оскільки середня похибка (відхилення) становить 4,62 %, а максимальна – 12,3 %. Тому ми використали вищезазначений метод для прогнозування кількості бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* в молоці залежно від впливу комплексу змінних величин: температури зберігання, масової частки жиру, масової частки білка, значень титрованої кислотності та впродовж зберігання його охолодженим.

Визначення ефективності методу прогнозування кількості бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* в молоці залежно від впливу комплексу змінних величин фізико-хімічних параметрів (температури зберігання, масової частки жиру, масової частки білку, значень титрованої кислотності) та впродовж зберігання його охолодженим із використанням комп'ютерної нейромережевої програми «NeuroPro», версія 0,25. Прогнозування кількості бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* в молоці

залежала від впливу комплексу змінних величин: температури зберігання, масової частки жиру, масової частки білка, терміну зберігання молока: при цьому вихідна кількість бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* становила 10 000 КУО/см³ (прогнозована величина). Ефективність запропонованого способу визначали шляхом порівняння результатів експериментальних досліджень та нейропрогнозування. Результати досліджень наведені в табл. 4.4.

Як бачимо з табл. 4.4, ступінь достовірності при застосуванні цього методу в середньому становить 4,62 %.

Таблиця 4.4 – Встановлення ефективності методу прогнозування кількості бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* в молоці залежно від впливу комплексу змінних величин фізико-хімічних параметрів, із використанням комп'ютерної нейромережевої програми «NeuroPro», версія 0,25

Температура зберігання молока, °С	Масова частка жиру в молоці, %	Кількість білка в молоці,	Кислотність молока, °Т	Термін зберігання молока, год	Нейропрогнозування	Ефективність методу (ступінь достовірності)	
						відхилення	відсоток
4	4,5	2,9	18	24	7487,31	512,69	5,13
6	4,0	2,9	18	12	10744,65	-144,65	12,3
6	3,6	3,3	19	10	10352,53	547,47	5,47
10	4,5	3,0	17	12	10573,05	-248,05	2,48

Прогнозування загальної кількості мікроорганізмів (КМАФАнМ), мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* та бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* в збірному охолодженому молоці

Вищезазначені дані експериментально обґрунтовують важливість контролю за мікробіологічними показниками сирого збірного молока в ланці зберігання його за низьких температур. Зберігання та транспортування молока за низьких температур упродовж певного часу називають «холодною ланкою» ланцюга виробництва сирого збірного молока. «Холодну ланку» виробництва молока згідно з принципами системи забезпечення безпечності харчових продуктів НАССР відносять до такої, на якій установлюється критична точка керування (КТК).

Оскільки вищезазначені результати досліджень свідчать про динамічність кількісного складу мікроорганізмів у сирому молоці корів упродовж холодильного зберігання і залежність цих показників від різних чинників, ефективний контроль за ними в КТК повинен здійснюватися комплексно: як безпосереднім періодичним мікробіологічним дослідженням проб молока, так і шляхом використання можливостей сучасних комп'ютерних програм. Однією з таких програм є програма «NeuroPro» з використанням нейронних мереж, що дає можливість розробляти методи прогнозування.

Нижче наведені дані щодо розроблення методу з використанням програми «NeuroPro» на підставі нейронних мереж для прогнозування в сирому збірному молоці КМАФАнМ, кількості мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* та бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) залежно від різних умов його холодильного зберігання.

Як зазначалося вище, при здійсненні ОМР повинен використовуватися такий методологічний підхід, як прогнозування кількості мікроорганізмів у продовольчій сировині чи харчових продуктах за певних умов їх виробництва чи обігу. В практиці ветеринарно-санітарного контролю ще не використовується такий методологічний підхід, хоча в багатьох розвинених країнах світу застосовується, а його результати сприяють гарантуванню мікробіологічної безпечності харчових продуктів.

Для прогнозування кількості мікроорганізмів у збірному охолодженому молоці застосовували комп'ютерну нейромережеву програму «NeuroPro», версія 0,25.

У цих дослідженнях вивчали можливість прогнозувати кількість мікроорганізмів у молоці гатунків «екстра» та «вищий» за різних умов його зберігання та транспортування в охолодженому стані.

При цьому наша увага була сконцентрована на прогнозуванні таких видів мікроорганізмів, як МАФАНМ, мікроорганізми родини *Enterobacteriaceae* та бактерії *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*. КМАФАНМ є показником, що належить до національно регульованого, мікроорганізми родини *Enterobacteriaceae* є регульованим показником у країнах ЄС та СОР, а також ми довели, що він дійсно може бути індикатором санітарії та індикатором бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*.

Спочатку ми прогнозували кількість мікроорганізмів під час зберігання молока охолодженим на фермі. В основу штучної нейронної мережі покладена сформована база даних, результати власних експериментальних досліджень, які ми одержали та подали в попередньому підрозділі монографії. За вхідні параметри для цієї програми використали такі показники: температуру холодильного зберігання та транспортування молока, термін зберігання (транспортування) молока, початкову кількість досліджуваних мікроорганізмів до охолодження (КМАФАНМ, мікроорганізми родини *Enterobacteriaceae* та бактерії *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*).

Зазначені параметри вводили до бази комп'ютерної програми «NeuroPro», версія 0,25, у вигляді взаємозв'язаних комплексів цифрових значень, які установили експериментально.

Унаслідок використання зазначеної програми одержували такі вихідні параметри, як кількість вищезазначених мікроорганізмів залежно від введених параметрів холодильного зберігання та транспортування. При чому програма давала можливість одержати прогностичні дані щодо вищезазначених мікроорганізмів залежно від будь-яких значень температурних параметрів

зберігання та транспортування. Тобто ми ввели певні ключові цифрові значення змодельованих процесів зберігання та транспортування молока в охолодженому стані, а за допомогою комп'ютерної програми можна змодельовати безліч різних комбінацій зазначених процесів та одержати прогностичні значення МАФАНМ, мікроорганізми родини *Enterobacteriaceae* та бактерії *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*).

Наші дослідження були спрямовані на визначення мікробіологічних характеристик сирого збірного молока гатунків «екстра» та «вищий».

Ефективність цього методу визначали шляхом порівняння результатів експериментальних досліджень та даних, одержаних у результаті нейропрогнозування програми «NeuroPro».

Оптимізовані результати досліджень щодо застосування запропонованого методу для прогнозування кількості мікроорганізмів наведені в таблицях 4.5–4.7 цього розділу.

Таблиця 4.5 – Результати прогнозування кількості МАФАНМ, мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* та бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) в збірному охолодженому молоці гатунку екстра під час зберігання за температури 4, 6, 8 °С

Температура зберігання молока, °С	Термін зберігання, год	Кількість мікроорганізмів, КУО/см ³		Ступінь достовірності	
		фактично	нейропрогнозування	відхилення	відсоток
1	2	3	4	5	6
Прогнозування кількості МАФАНМ (середня похибка – 1 750 КУО/см ³ , максимальна – 3 000 КУО/см ³)					
4	12	57 000	58 180	–1 180	2,1
	24	63 000	65 500	–2 500	4,0
6	12	62 400	59 400	+3 000	4,8

Продовження таблиці 4.5

1	2	3	4	5	6
	24	68 000	69 800	+1 800	2,6
8	12	75 000	76 600	+1 600	2,1
	24	80 000	81 550	+1 550	1,9
Прогнозування кількості мікроорганізмів родини <i>Enterobacteriaceae</i> (середня похибка – 505 КУО/см ³ , максимальна – 959 КУО/см ³)					
4	12	6 800	6 924	–124	1,8
	24	8 800	8 450	+349	4,0
6	12	8 100	7 970	+129	1,6
	24	10 400	11 237	–837	8,0
8	12	15 000	14 165	+834	5,6
	24	16 000	15 282	–717	4,5
Прогнозування кількості <i>Cronobacter spp. (E. sakazakii)</i> (середня похибка – 6 КУО/см ³ , максимальна – 10 КУО/см ³)					
4	12	6	4	–2	3,3
	24	8	6	–2	25
6	12	8	7	–1	12,5
	24	24	24	0	–
8	12	75	66	+8	10,7
	24	144	133	+10	7,0

Спочатку прогнозування кількості бактерій проводили в молоці гатунку «екстра», в якому одразу після збирання на фермі середня кількість бактерій була 58 000 КУО/см³ (табл. 4.5).

Дані таблиці 4.5 свідчать про те, що за умов стаціонарних режимів зберігання молока гатунку «екстра», середні максимальні й мінімальні відхилення в показниках прогнозування щодо кількості мікроорганізмів знаходиться в межах від 1,6 до 12,5 %. Програмою «NeuroPro» було встановлено, що при прогнозуванні КМАФАНМ середня похибка становила 1 750 КУО/см³, а максимальна – 3 000 КУО/см³, при прогнозуванні кількості мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* середня похибка – 505 КУО/см³, а максимальна – 959 КУО/см³, при прогнозуванні кількості *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* ці показники були 6 та 10 КУО/см³ відповідно.

Це підтверджує те, що даний метод можна використовувати для прогнозування вище кількості зазначених мікроорганізмів у сирому збірному молоці корів під час його зберігання та транспортування.

У таблиці 4.6 наведено результати прогнозування кількості МАФАНМ мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* та бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) в збірному охолодженому молоці вищого гатунку при зберіганні його охолодженим.

Таблиця 4.6 – Результати прогнозування кількості МАФАНМ мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* та бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) в молоці збірному охолодженому вищого гатунку при зберіганні за температури 4, 6, 8 °С

Температура зберігання молока, °С	Термін зберігання, год	КМАФАНМ, КУО/см ³		Ступінь достовірності	
		фактично	нейропрогнозування	відхилення	відсоток
1	2	3	4	5	6
Прогнозування кількості МАФАНМ (середня похибка – 8 500 КУО/см ³ , максимальна – 16 000 КУО/см ³)					
4	12	112 000	128 000	+11 600	10,4
	24	153 000	137 200	-15 800	10,3
6	12	157 000	147 000	-10 000	6,4
	24	198 000	214 000	+16 000	8,1
8	12	252 000	247 500	-4 500	1,8
	24	279 000	263 000	-16 000	5,7
Прогнозування кількості мікроорганізмів родини <i>Enterobacteriaceae</i> (середня похибка – 2 800 КУО/см ³ , максимальна – 4 000 КУО/см ³)					
4	12	16 500	20 500	+4 000	24,2
	24	29 100	28 950	-150	0,5
6	12	26 700	23 600	-3 100	11,6
	24	41 700	42 300	+600	1,4
8	12	57 900	56 900	1 000	1,7

Продовження таблиці 4.6

1	2	3	4	5	6
	24	75 300	75 000	300	0,4
Прогнозування кількості <i>Cronobacter spp. (E. sakazakii)</i> (середня похибка – 24 КУО/см ³ , максимальна – 106 КУО/см ³)					
4	12	32	36	–4	12,5
	24	76	64	+12	15,8
6	12	80	76	+4	5,0
	24	208	208	0	–
8	12	579	664	–85	14,7
	24	1130	1023	–106	9,4

Як бачимо з табл. 4.6, експериментальні моделі, введені до програми «NeuroPro» після відповідного комп'ютерного оброблення, дали результати, що мали певні відхилення від одержаних у дослідях. Ці відхилення були дещо вищими, ніж у попередній серії досліджень стосовно молока ґатунку «екстра». Відхилення, одержані в цих дослідженнях були на 2–7 % (а в деяких випадках і на 10–15 %) вищими ніж під час прогнозування кількості мікроорганізмів у молоці ґатунку «екстра». Це можна пояснити тим, що в молоці вищого ґатунку порівняно з молоком ґатунком «екстра» досліджувані мікроорганізми знаходилися в значно більших кількостях.

Дані таблиці 4.6 свідчать про те, що прогнозування кількості таких мікроорганізмів, як МАФАНМ, мікроорганізми родини *Enterobacteriaceae* та бактерії *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* в збірному молоці ґатунку екстра під час транспортування можливе, причому з великою часткою достовірності, оскільки комп'ютерна програма надає прогнозовані значення цих мікроорганізмів з відхиленнями в межах у середньому від 0,1 до 15 % (в окремих випадках більше ніж 20 %). Ці відхилення також вважаються прийнятними і метод може бути використаним для умов транспортування сирого молока ґатунку «екстра».

У таблиці 4.7 наведено показники як експериментальних даних, так і нейропрогнозування стосовно кількості МАФАНМ, мікроорганізмів родини

Enterobacteriaceae та бактерії *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* в сирому молоці вищого гатунку під час транспортування.

У цих дослідях нейропрогнозування щодо даних, одержаних експериментально, мало також неістотні відхилення. Ці відхилення в середньому були в межах від 1,5 до 10 % (в деяких випадках 20 %), що вважається прийнятним для нейропрогнозування.

Необхідно також відзначити, що нейропрогнозування при використанні експериментальних даних стосовно кількості мікроорганізмів під час транспортування молока гатунків «екстра» та «вищий» було більш рівномірним за своїми абсолютними показниками й за показниками відхилень, що можна пояснити нетривалим терміном перевезення, який ми дослідили (в межах 60 хвилин). Ми обрали такий термін тому, що він вважається найбільш оптимальним для перевезення.

Таблиця 4.7 – Результати прогнозування кількості МАФАНМ, мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* та бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* в збірному охолодженому молоці гатунку екстра під час транспортування за температури 4, 6, 8 °С

Температура зберігання молока, °С	Термін транспортування, хв	Кількість мікроорганізмів, КУО/см ³		Ступінь достовірності	
		фактично	нейропрогнозування	відхилення	відсоток
1	2	3	4	5	6
Прогнозування кількості МАФАНМ (середня похибка – 2 000 КУО/см ³ , максимальна – 3 000 КУО/см ³)					
4	30	58 000	60 000	+2 000	3,4
	60	62 000	65 000	+3 000	4,8
6	30	63 000	62 500	-500	0,8
	60	68 000	71 000	+3 000	4,4
8	30	79 000	79 100	+100	0,1
	60	81 000	82 500	+ 1 500	1,9

Продовження таблиці 4.7

Прогнозування кількості мікроорганізмів родини <i>Enterobacteriaceae</i> (середня похибка – 900 КУО/см ³ , максимальна – 1 500 КУО/см ³)					
4	30	7 000	8 200	+1 200	17,1
	60	8 100	8 250	+150	1,9
6	30	8 200	9 300	+1 100	13,4
	60	9 500	8 700	-1 200	12,6
8	30	17 400	17 900	+500	2,9
	60	18 600	20 100	1 500	8,1
Прогнозування кількості <i>Cronobacter spp. (E. sakazakii)</i> (середня похибка – 8 КУО/см ³ , максимальна – 15 КУО/см ³)					
4	30	7	9	+2	28,6
	60	8	10	+2	25
6	30	15	14	-1	6,7
	60	17	20	+3	17,6
8	30	104	97	-7	6,7
	60	75 130	145	+15	11,5

За необхідності прогнозування при більш тривалому періоді транспортування, можливість прогнозування за цим методом також не виняток.

Таблиця 4.8 – Результати прогнозування кількості МАФАНМ, мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* та бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* в збірному охолодженому молоці вищого ґатунку під час транспортування за температури 4, 6, 8 °С

Температура зберігання молока, °С	Термін транспортування, год	КМАФАНМ, КУО/см ³		Ступінь достовірності	
		фактично	нейропрогнозування	відхилення	відсоток
4	30	115 000	125 000	+10 000	8,7
	60	132 000	130 000	-2 000	1,5
6	30	162 000	157 000	-5 000	3,1
	60	168 000	160 000	-8 000	4,8

Продовження таблиці 4.8

8	30	263 000	279 500	+16 500	6,2
	60	270 000	280 000	+10 000	3,7
Прогнозування кількості мікроорганізмів родини <i>Enterobacteriaceae</i> (середня похибка – 4 500 КУО/см ³ , максимальна – 6 500 КУО/см ³)					
4	30	17 300	20 000	+2 700	15,6
	60	22 400	24 000	+1 600	7,1
6	30	29 200	32 000	+800	2,7
	60	31 900	38 400	+ 6 500	20,3
8	30	65 800	67 000	+1 200	1,8
	60	68 500	72 500	+4 000	5,8
Прогнозування кількості <i>Cronobacter spp. (E. sakazakii)</i> (середня похибка – 62 КУО/см ³ , максимальна – 100 КУО/см ³)					
4	30	35	31	–4	11,4
	60	44	40	–4	9,1
6	30	87	90	+3	3,4
	60	95	100	+5	5,3
8	30	729	800	+71	9,7
	60	778	878	+100	12,8

Отже, як бачимо з табл. 4.5–4.8, результати використання запропонованого нами методу прогнозування кількості мікроорганізмів у сирому молоці свідчать про можливість використання його як швидкого та ефективного способу визначення мікробіологічного складу молока під час його зберігання та транспортування за різних значень температури охолодження і терміну зберігання та транспортування.

Нижче наведемо приклади щодо можливостей цього методу прогнозування за умов використання різних параметрів «холодної ланки» ланцюга виробництва сирого збірного молока гатунків «екстра» та «вищий» (табл. 4.9, 4.10).

Таблиця 4.9 – Результати використання методу прогнозування кількості МАФАНМ, мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* та бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) в збірному охолодженому молоці гатунку «екстра» за різних параметрів зберігання

Температура зберігання молока, °С	Термін зберігання, год	Вихідна кількість мікроорганізмів	Результат нейропрогнозування
Прогнозування кількості МАФАНМ (середня похибка – 1 750 КУО/см ³ , максимальна – 3 000 КУО/см ³)			
4	15	5 8000	59 100
6	21	5 8000	62 920
7	20	5 8000	73 100
Прогнозування кількості мікроорганізмів родини <i>Enterobacteriaceae</i> (середня похибка – 505 КУО/см ³ , максимальна – 959 КУО/см ³)			
4	11	5 800	7048
6	8	5 800	7095
8	15	5 800	15 011
Прогнозування кількості <i>Cronobacter spp.</i> (<i>E. sakazakii</i>) (середня похибка 6 КУО/см ³ , максимальна – 10 КУО/см ³)			
6	15	3	21
6	17	3	21
7	20	3	35

Таблиця 4.10 – Результати використання методу прогнозування кількості МАФАНМ, мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* та бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* в молоці вищого гатунку за різних параметрів зберігання

Температура зберігання молока, °С	Термін зберігання, год	Вихідна кількість мікроорганізмів	Результат нейропрогнозування
Прогнозування кількості МАФАНМ (середня похибка – 2 000 КУО/см ³ , максимальна – 3 000 КУО/см ³)			
6	15	120 000	130 000
6	21	120 000	150 000
8	13	120 000	220 000
Прогнозування кількості мікроорганізмів родини <i>Enterobacteriaceae</i> (середня похибка – 900 КУО/см ³ , максимальна – 1 500 КУО/см ³)			
4	20	16 800	22150
6	8	16 800	21650
8	16	16 800	68000
Прогнозування кількості <i>Cronobacter spp. (E. sakazakii)</i> (середня похибка – 8 КУО/см ³ , максимальна – 15 КУО/см ³)			
6	15	19	100
6	17	19	112
7	20	9	380

За результатами цього підрозділу монографії роботи можна зробити висновок, що такі важливі мікробіологічні показники сирого збірного молока гатунків «екстра» та «вищий», як КМАФАНМ, кількість бактерій родини *Enterobacteriaceae* та бактерії *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*, які є індикаторами рівня гігієни та санітарії на молочній фермі, можна та необхідно контролювати шляхом прогнозування з використанням комп'ютерної програми «NeuroPro», версія 0,25, та штучних нейронних мереж.

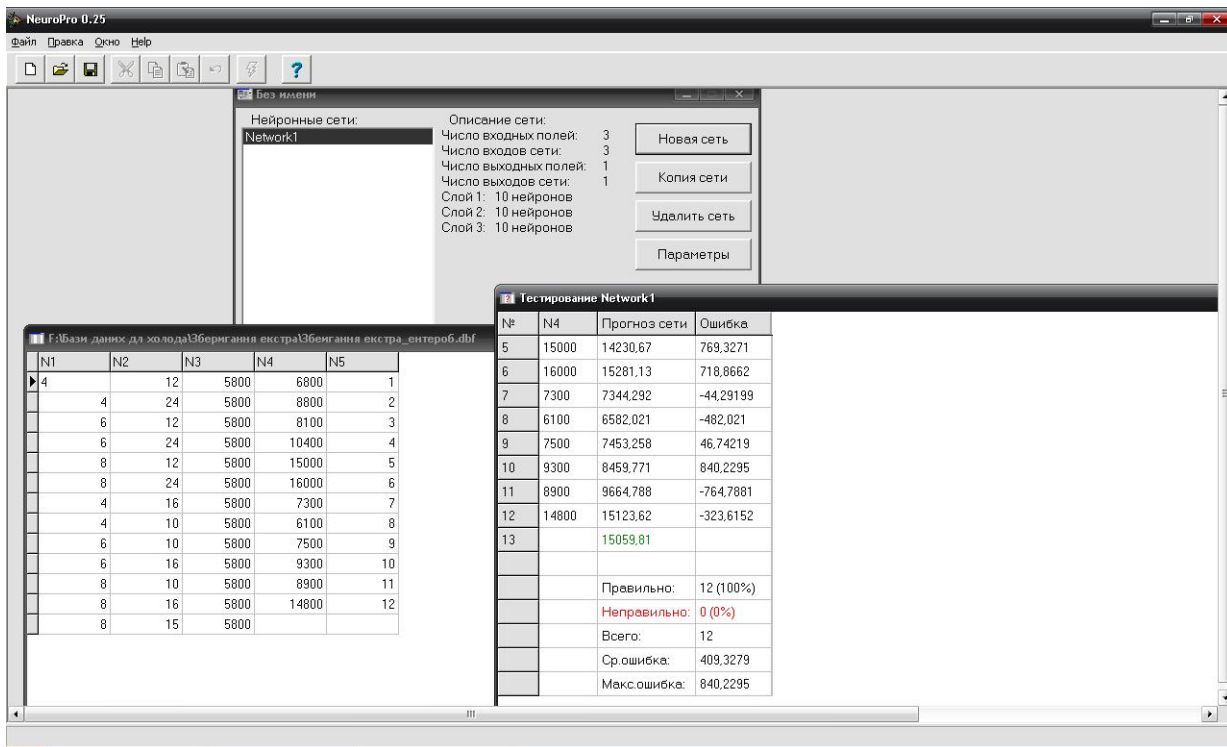


Рисунок 4.18 – Зовнішній вигляд комп’ютерної програми «NeuroPro», версія 0,25

Запропонований метод прогнозування дає можливість передбачувати ймовірне підвищення кількості вищезазначених мікроорганізмів у сирому збірному молоці, призначеному для здавання на молокопереробні підприємства безпосередньо самим фермером. Сучасні ферми оснащені комп’ютерами і використання зазначеного методу не буде проблемним, і в той самий час результати прогнозування кількісного складу вищезазначених мікроорганізмів в сирому молоці корів сприятиме налагодженню ефективного контролю в КТК «холодна ланка» ланцюга виробництва сирого збірного молока та своєчасному застосуванню корегуючих заходів у ній.

Вивчення впливу параметрів пастеризації на кількість мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* та бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) в збірному молоці корів. Охарактеризувати ризик щодо бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) в збірному молоці корів можна лише встановленням їх залишкової кількості після його термічного оброблення.

Оскільки саме ті бактерії *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*, що залишилися після пастеризації становлять собою ризик для споживачів. Отже, логічно, ми вивчили «гарячу ланку» в ланцюзі виробництва молока – ланка, на якій відбувається пастеризація. Загальновідомо, що для пастеризації сирого збірного молока молокопереробні підприємства найчастіше використовують три види пастеризації молока для зменшення кількості небажаних мікроорганізмів у ньому: тривала пастеризація – за температури 63–65 °С витримуванням 15–30 хв, коротко часова пастеризація – за температури 72–75 °С витримуванням 15–30 с та миттєва пастеризація – за температури 85–90 °С без витримування.

Найбільш часто на практиці використовують два перших із вищезазначених режимів пастеризації. А на цей час, коли для виробника є важливим використання процесів з економним режимом електроенергії – пастеризація молока за температури 63–65 °С переважає на більшості молокопереробних підприємств. Від ефективності пастеризації молока залежить ступінь безпечності готових молокопродуктів. У зв'язку з цим така ланка ланцюга виробництва молокопродуктів, як пастеризація, вважається КТК. Ми вивчили ефективність різних режимів пастеризації сирого збірного молока гатунків «екстра» та «вищий» щодо загальної кількості мікроорганізмів (КМАФАнМ), мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* та бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*, а також режими пастеризації сирого збірного молока з використанням температур $(62 \pm 1) ^\circ\text{C}$ упродовж 15 хвилин та 30 хвилин і $(72 \pm 1) ^\circ\text{C}$ упродовж 15 секунд та 30 секунд. Результати досліджень наведено в таблицях 4.11 та 4.12.

Як бачимо з таблиці 4.11, при вивченні впливу пастеризації за температури $(62 \pm 1) ^\circ\text{C}$ упродовж 15 хвилин було встановлено, що вона була ефективною щодо КМАФАнМ на 82,3–89,8 % ($p \leq 0,05$; $p \leq 0,01$), залежно від їх початкової кількості.

Таблиця 4.11 – Результати вивчення впливу параметрів пастеризації залежно від кількості мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* та бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) в збірному молоці корів ($M \pm m$, $n = 7$)

Досліджуваний показник	Гатунок молока			
	«екстра»	«екстра»	«вищий»	«вищий»
Показники до пастеризації				
КМАФАнМ, тис. КУО/см ³	58 ± 1,7	90 ± 1,5	152 ± 0,8	290 ± 1,4
Мікроорганізми родини <i>Enterobacteriaceae</i> , тис. КУО/см ³	7,0 ± 1,4	22,5 ± 0,2	29,9 ± 1,3	98,6 ± 12,0
Бактерії <i>E. sakazakii</i> , КУО/см ³	17 ± 0,3	169 ± 22,4	480 ± 36,2	1 270 ± 109,1
Показники після пастеризації за параметрів (62 ± 1) °С упродовж 15 хв (ефективність, %)				
КМАФАнМ, тис. КУО/см ³	5,9 ± 2,4** (89,8 %)	11,25 ± 2,7** (87,5 %)	21,6 ± 3,2* (85,8 %)	51,33 ± 12,6* (82,3 %)
Мікроорганізми родини <i>Enterobacteriaceae</i> , КУО/см ³	8 ± 2,5** (99,9 %)	63 ± 10,2** (99,8 %)	108 ± 15,5 (99,6 %)	320 ± 12,8* (99,6 %)
Бактерії <i>E. sakazakii</i> , КУО/см ³	0 (100 %)	25 ± 4,3* (99,8 %)	47 ± 12,6* (99,8 %)	127 ± 12,9*** (99,7 %)
Показники після пастеризації за параметрів (62 ± 1) °С упродовж 30 хв (ефективність, %)				
КМАФАнМ, тис. КУО/см ³	4,4 ± 1,2* (92,4 %)	7,7 ± 0,9* (91,5 %)	15,0 ± 1,2* (90,1 %)	29,5 ± 1,2* (89,8 %)
Мікроорганізми родини <i>Enterobacteriaceae</i> , КУО/см ³	0 (100 %)	0 (100 %)	0 (100 %)	8 ± 1,2* (98,2 %)
Бактерії <i>E. sakazakii</i> , КУО/см ³	0 (100 %)	0 (100 %)	0 (100 %)	0 (100 %)

* – $p \leq 0,05$; ** – $p \leq 0,01$; *** – $p \leq 0,001$ – щодо показників до пастеризації

Ефективність цих параметрів пастеризації стосовно мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* становила в середньому від 99,6 % ($p \leq 0,05$) для молока вищого гатунку з максимальною кількістю мікроорганізмів цієї родини і

до 99,9 % ($p \leq 0,01$) – для молока гатунку «екстра». Що стосується бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*, то за наявності в молоці невеликої їх кількості (7 ± 2 КУО/см³ в молоці гатунку «екстра») пастеризація за температури (62 ± 1) °С упродовж 15 хвилин була ефективною на 100 %. За наявності значної кількості цих мікроорганізмів (1298 ± 35 КУО/см³ у молоці вищого гатунку) ефективність пастеризації була дещо нижчою і становила 99,7 % ($p \leq 0,001$).

Аналізуючи ефективність пастеризації за параметрів (62 ± 1) °С упродовж 30 хвилин, можна стверджувати, що використання таких режимів зменшує кількість МАФАНМ у 11,7–13,2 рази ($p \leq 0,05$) в молоці гатунку «екстра» і в 1–14,9 рази ($p \leq 0,05$) – молоці вищого гатунку порівняно з цим показником до пастеризації. Крім того, ці режими пастеризації є на 100 % ефективними щодо мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* та бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* для обох гатунків молока.

У таблиці 4.12 наведені результати вивчення ефективності пастеризації за параметрів (72 ± 1) °С упродовж 15 секунд та 30 секунд на різні групи мікроорганізмів у молоці гатунків «екстра» та «вищий».

Як бачимо з таблиці 4.11, при застосуванні пастеризації з параметрами (72 ± 1) °С упродовж 15 секунд є в середньому більше ніж на 96 % ($p \leq 0,01$) ефективною стосовно МАФАНМ у молоці гатунку «екстра» та на 94 % ($p \leq 0,01$, $p \leq 0,001$) – у молоці вищого гатунку. Що стосується мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae*, то ці параметри пастеризації є на 100 % ефективними до цієї групи мікроорганізмів у молоці гатунку «екстра».

Крім того, ці режими пастеризації є на 100 % ефективними щодо мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* та бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* для обох гатунків молока.

Таблиця 4.12 – Результати вивчення впливу параметрів пастеризації залежно від кількості мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* та бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* в збірному молоці корів ($M \pm m, n = 7$)

Досліджуваний показник	Гатунки молока			
	«екстра»	«екстра»	«вищий»	«вищий»
Показники до пастеризації				
КМАФАнМ, тис. КУО/см ³	58 ± 1,7	90 ± 1,5	152 ± 0,8	290 ± 1,4
Мікроорганізми родини <i>Enterobacteriaceae</i> , тис. КУО/см ³	7,0 ± 1,4	22,5 ± 0,2	29,9 ± 1,3	98,6 ± 12,0
Бактерії <i>E. sakazakii</i> , КУО/см ³	17 ± 0,3	169 ± 22,4	480 ± 36,2	1 270 ± 109,1
Показники після пастеризації за параметрів (72 ± 1) °С упродовж 15 секунд (ефективність, %)				
КМАФАнМ, тис. КУО/см ³	1,7 ± 0,2** (97,0 %)	3,15 ± 0,2** (96,5 %)	6,4 ± 1,5*** (95,8 %)	20,6 ± 2,1** (92,9 %)
Мікроорганізми родини <i>Enterobacteriaceae</i> , КУО/см ³	0 (100 %)	0 (100 %)	4 ± 1,3 (99,9 %)	8 ± 2 (99,8 %)
Бактерії <i>E. sakazakii</i> , КУО/см ³	0 (100 %)	0 (100 %)	0 (100 %)	0 (100 %)
Показники після пастеризації за параметрів (72 ± 1) °С упродовж 30 секунд (ефективність, %)				
КМАФАнМ, тис. КУО/см ³	0,7 ± 0,1*** (98,7 %)	2,3 ± 0,9** (97,5 %)	4,2 ± 0,7* (97,1 %)	9,3 ± 1,5* (96,8 %)
Мікроорганізми родини <i>Enterobacteriaceae</i> , КУО/см ³	0 (100 %)	0 (100 %)	0 (100 %)	3 ± 1 (99,9 %)
Бактерії <i>E. sakazakii</i> , КУО/см ³	0 (100 %)	0 (100 %)	0 (100 %)	0 (100 %)

* – $p \leq 0,05$; ** – $p \leq 0,01$; *** – $p \leq 0,001$ – щодо показників до пастеризації

Дослідження показали, що використання температури пастеризації (72 ± 1) °С упродовж 30 секунд на 96,8–98,7 % зменшує кількість МАФАнМ, на

99,9–100 % – кількість мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* та на 100 % – бактерії *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* в обох гатунках молока.

Отже, з вищенаведеного можна зробити висновок про те, що найбільш ефективною пастеризацією щодо мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* і зокрема бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* є застосування температури $(62 \pm 1) ^\circ\text{C}$ упродовж 30 хвилин та $(72 \pm 1) ^\circ\text{C}$ – 15 та 30 секунд.

РОЗДІЛ 5

ХАРАКТЕРИСТИКА РИЗИКУ

У процесі характеристики ризику проводять опис типів і ступеней несприятливих ефектів. Установлюється ймовірність розвитку шкідливого ефекту для певного сценарію експозиції мікроорганізмами на підставі даних оцінки експозиції і можливих відповідей з боку здоров'я, зокрема одержаних у наслідок динамічного моделювання. Результатом характеристики відповідей може бути ймовірність розвитку захворювання при надходженні певної кількості мікроорганізмів.

На етапі характеристики ризику проводять інтеграцію всіх даних, одержаних у ході ідентифікації і характеристики небезпеки, оцінки експозиції, якісно і кількісно встановлюється ймовірність і тяжкість змін із боку експонованої популяції, включаючи опис супутніх невизначеностей. Виділяють якісну й кількісну оцінки мікробіологічного ризику.

Якісну ОМР застосовують частіше для визначення необхідності подальших досліджень, вона базується на сформованих фахівцями, які проводять дослідження, експертних оцінках. На підставі якісного ОМР може бути зроблено висновок про те, що ризик «незначний», «низький», «середній», «високий» і «дуже високий».

Кількісну ОМР проводять із використанням ймовірних та детермінованих моделей і є більш інформативною, ніж якісна. При цьому розглядається ймовірність захворювання за одноразового вживання стандартної порції харчового продукту і/або ймовірність захворювання під час вживання харчового продукту впродовж певного періоду.

Характеристика ризику стосовно бактерій *Cronobacter spp.* (*Enterobacter sakazakii*) в сирому молоці корів. Характеристика ризику стосовно бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) в сирому молоці корів є завершальним підсумовувальним етапом ОМР. На цьому етапі на підставі одержаних раніше експериментальних даних вимальовується цілісна картина

щодо ОМР. Даний розділ монографії має на меті встановити конкретну оцінку ризику стосовно бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* в молоці корів у харчовому ланцюзі його виробництва.

Ми визначили такі ключові ланки харчового ланцюга виробництва молока гатунків «екстра» та «вищий»:

- ✓ збірне молоко неохолоджене;
- ✓ збірне молоко охолоджене;
- ✓ пастеризація сирого збірного молока.

Ми встановили, що основним критерієм оцінки ризику є одержання результатів досліджень щодо ефективності різних режимів пастеризації за різних ступенів мікробної контамінації сирого молока мікроорганізмами. Отже, характеристику ризику стосовно бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* в сирому молоці корів ми проводили комплексно з акцентом на такі основні показники, як:

а) ступінь контамінації молока сирого різних гатунків мікроорганізмами родини *Enterobacteriaceae* та бактеріями *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*;

б) установлення інформативних значень співвідношення між кількістю мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* та бактеріями *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* для оцінки ризику від цих мікроорганізмів;

в) оцінка ризику *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* при зберіганні сирого молока в охолодженому вигляді та під час транспортування, тобто в «холодній ланці» харчового ланцюга його виробництва;

г) оцінка ризику *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* з урахуванням дії пастеризації на досліджувані мікроорганізми сирого молока, тобто оцінка ризику в «гарячій ланці» харчового ланцюга його виробництва.

Таким чином, характеристику ризику стосовно бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* ми оцінили шляхом аналізу комплексу показників, одержаних експериментально, яка базується на дослідженнях, наведених у попередніх розділах монографії.

Необхідно зазначити, що ми оцінили ризик стосовно бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* та мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae*, оскільки нашим дослідженням було встановлено прямо-пропорційну залежність між цими мікроорганізмами. Причому кількість мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* характеризують рівень санітарно-гігієнічного стану об'єктів молочної ферми, що можуть бути потенційними джерелами такого небезпечного патогену, як *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*.

Щоб дати повну характеристику ризику *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* в сирому молоці корів, ми визначили як його якісні, так і кількісні значення. До якісних значень характеристики ризику *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* ми використовували позначення: «низький», «середній», «високий». Ці значення встановлювались у взаємозв'язку з відповідними їм кількісними показниками характеристик ризику. Таким чином, ми сформували цілісну картину щодо характеристики ризику *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* в сирому молоці корів за трьома ступенями ризику. Результати досліджень дали можливість нам сформувати основні показники, що характеризують ступінь ризику стосовно бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* в сирому молоці корів гатунків «екстра» та «вищий», що наведених в таблицях 5.1 та 5.2.

Таблиця 5.1 – Характеристика ризику стосовно бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* для молока гатунку «екстра» ($M \pm m, n = 7$)

Показники характеристики ризику	Оцінка ступеня ризику (середні оптимальні значення)		
	низький	середній	високий
1	2	3	4
Збірне молоко неохолоджене			
1. Кількість мікроорганізмів родини <i>Enterobacteriaceae</i> , тис. КУО/см ³	3,5 ± 0,1	5,8 ± 0,1	8,1 ± 0,5
2. Кількість бактерій <i>E. sakazakii</i> , КУО/см ³	0	3 ± 1	6 ± 2

Продовження таблиці 5.1

1	2	3	4
3. Співвідношення кількості мікроорганізмів родини <i>Enterobacteriaceae</i> до кількості бактерій <i>Cronobacter spp.</i> (<i>E. sakazakii</i>)	–	1:1930	1:1350
Збірне молоко охолоджене			
4. Кількість мікроорганізмів родини <i>Enterobacteriaceae</i> при зберіганні молока, тис. КУО/см ³	6,8 ± 1,7	11,4 ± 1,4	16,0 ± 1,1
5. Кількість бактерій <i>Cronobacter spp.</i> (<i>E. sakazakii</i>) після зберігання молока, КУО/см ³	5 ± 1	75 ± 9	144 ± 17
6. Кількість мікроорганізмів родини <i>Enterobacteriaceae</i> після транспортування молока, тис. КУО/см ³	7,0 ± 1,4	17,91 ± 2,5	22,5 ± 0,2
7. Кількість бактерій <i>Cronobacter spp.</i> (<i>E. sakazakii</i>) після транспортування молока, КУО/см ³	17 ± 0,3	124 ± 21,4	169 ± 22,4
Пастеризація сирого збірного молока			
8. Кількість мікроорганізмів родини <i>Enterobacteriaceae</i> під час пастеризації сирого молока за температури (62 ± 1) °C упродовж 15 хвилин, КУО/см ³	8 ± 2,1	35 ± 3,4	63 ± 4,7
9. Кількість бактерій <i>Cronobacter spp.</i> (<i>E. sakazakii</i>) після пастеризації сирого молока за температури (62 ± 1) °C упродовж 15 хвилин, КУО/см ³	0	2 ± 0,4	25 ± 5,9
10. Кількість мікроорганізмів родини <i>Enterobacteriaceae</i> після пастеризації сирого молока за температури (62 ± 1) °C упродовж 30 хвилин, КУО/см ³	0	0	28 ± 2,7
11. Кількість бактерій <i>Cronobacter spp.</i> (<i>E. sakazakii</i>) після пастеризації сирого молока за температури (62 ± 1) °C упродовж 30 хвилин, КУО/см ³	0	0	3 ± 0,7

Продовження таблиці 5.1

1	2	3	4
12. Кількість мікроорганізмів родини <i>Enterobacteriaceae</i> після пастеризації сирого молока за температури $(72 \pm 1) ^\circ\text{C}$ упродовж 15 секунд, КУО/см ³	0	0	0
13. Кількість бактерій <i>Cronobacter spp.</i> (<i>E. sakazakii</i>) після пастеризації сирого молока за температури $(72 \pm 1) ^\circ\text{C}$ упродовж 15 секунд, КУО/см ³	0	0	0
14. Кількість мікроорганізмів родини <i>Enterobacteriaceae</i> після пастеризації сирого молока за температури $(72 \pm 1) ^\circ\text{C}$ упродовж 30 секунд, КУО/см ³	0	0	0
15. Кількість бактерій <i>Cronobacter spp.</i> (<i>E. sakazakii</i>) після пастеризації сирого молока за температури $(72 \pm 1) ^\circ\text{C}$ упродовж 30 секунд, КУО/см ³	0	0	0

Із даних таблиці 5.1 можна зробити висновок, що ризик від бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) в сирому молоці корів гатунку екстра характеризується в основному як середній та низький, але це з врахуванням того, що буде проведено пастеризацію молока перед використанням його в технологічному процесі виробництва молокопродуктів.

Застосування термічного режиму оброблення сирого молока гатунку «екстра» за температурними параметрами $(62 \pm 1) ^\circ\text{C}$ упродовж 15 хвилин із початковим вмістом мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* в кількостях від $(7,0 \pm 1,4)$ до $(22,5 \pm 0,2)$ тис. КУО/см³ забезпечує їх знищення в середньому до $(35 \pm 3,4)$ КУО/см³. У той самий час цей термічний режим оброблення сирого молока повністю знищує бактерії *E. sakazakii*, за умови якщо в молоці гатунку «екстра» кількість мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* є меншою (в середньому $(17,0 \pm 0,3)$ тис. КУО/см³). Проте бактерії *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) залишаються в пастеризованому молоці середньою кількістю $(2 \pm 0,4)$ КУО/см³, якщо кількість мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* є

вищою і в середньому становить $(124 \pm 21,4)$ КУО/см³. Це свідчить про середній ризик такого молока стосовно мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* і бактерій *E. sakazakii*. При збільшенні залишкової кількості бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) в середньому до $(25 \pm 5,9)$ КУО/см³ свідчить про високий ризик такого молока.

Використання режиму пастеризації (62 ± 1) °С упродовж 30 хвилин для молока ґатунку «екстра» є на 100 % ефективним для повного знищення як мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae*, так і бактерій *E. sakazakii*. Це також стосується використання підвищених режимів пастеризації молока ґатунку «екстра», наприклад, таких як (72 ± 1) °С упродовж 15 секунд та 30 секунд.

Тобто сире молоко, яке виробляється із середнім значенням загальної кількості мікроорганізмів (КМАФАнМ) до 100 тис. КУО/см³ при пастеризації за температури (62 ± 1) °С упродовж 30 хвилин, 72 °С – 15 секунд та 30 секунд не становить ризику для готової молокопродукції.

У таблиці 5.2 наведено характеристику ризику стосовно бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) для молока вищого ґатунку з різними значеннями вмісту досліджуваних мікроорганізмів у динаміці, починаючи від початкової їх кількості, потім при охолодженні та під час пастеризації.

Таблиця 5.2 – Характеристика ризику стосовно бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) для молока вищого ґатунку ($M \pm m, n = 7$)

Показники характеристики ризику	Оцінка ступеня ризику (середні оптимальні значення)		
	низький	середній	високий
1	2	3	4
Збірне молоко неохолоджене			
1. Кількість мікроорганізмів родини <i>Enterobacteriaceae</i> , тис. КУО/см ³	10,6 ± 0,1	16,8 ± 0,2	23,0 ± 0,3
2. Кількість бактерій <i>Cronobacter spp.</i> (<i>E. sakazakii</i>), КУО/см ³	12 ± 2	19 ± 3	26 ± 4

Продовження табл. 5.2

1	2	3	4
3. Співвідношення кількості мікроорганізмів родини <i>Enterobacteriaceae</i> до кількості бактерій <i>Cronobacter spp.</i> (<i>E. sakazakii</i>)	1:883	1:800	1:885
Збірне молоко охолоджене			
4. Кількість мікроорганізмів родини <i>Enterobacteriaceae</i> при зберіганні молока, тис. КУО/см ³	17,9 ± 0,1	46,6 ± 0,4	98,6 ± 12,0
5. Кількість бактерій <i>Cronobacter spp.</i> (<i>E. sakazakii</i>) після зберігання молока, КУО/см ³	225 ± 17,9	576 ± 35,3	1094 ± 43,8
6. Кількість мікроорганізмів родини <i>Enterobacteriaceae</i> після транспортування молока, тис. КУО/см ³	17,3 ± 1,3	50,3 ± 1,3	83,2 ± 1,2
7. Кількість бактерій <i>Cronobacter spp.</i> (<i>E. sakazakii</i>) після транспортування молока, КУО/см ³	480 ± 36,2	875 ± 98,4	1270 ± 109,1
Пастеризація сирого збірного молока			
8. Кількість мікроорганізмів родини <i>Enterobacteriaceae</i> після пастеризації сирого молока за температури (62 ± 1) °С упродовж 15 хвилин, КУО/см ³	108 ± 15,4	214 ± 16,7	320 ± 18,8
9. Кількість бактерій <i>Cronobacter spp.</i> (<i>E. sakazakii</i>) після пастеризації сирого молока за температури (62 ± 1) °С упродовж 15 хвилин, КУО/см ³	10 ± 2,1	87 ± 7,2	127 ± 12,5
10. Кількість мікроорганізмів родини <i>Enterobacteriaceae</i> після пастеризації сирого молока за температури (62 ± 1) °С упродовж 30 хвилин, КУО/см ³	0	4 ± 1,3	8 ± 2,5

Продовження табл. 5.2

1	2	3	4
11. Кількість бактерій <i>Cronobacter spp. (E. sakazakii)</i> після пастеризації сирого молока за температури $(62 \pm 1) ^\circ\text{C}$ упродовж 30 хвилин, КУО/см ³	0	0	0
12. Кількість мікроорганізмів родини <i>Enterobacteriaceae</i> після пастеризації сирого молока за температури $(72 \pm 1) ^\circ\text{C}$ упродовж 15 секунд, КУО/см ³	0	$5 \pm 2,1$	$15 \pm 2,3$
13. Кількість бактерій <i>Cronobacter spp. (E. sakazakii)</i> після пастеризації сирого молока за температури $(72 \pm 1) ^\circ\text{C}$ упродовж 15 секунд, КУО/см ³	0	0	0
14. Кількість мікроорганізмів родини <i>Enterobacteriaceae</i> після пастеризації сирого молока за температури $(72 \pm 1) ^\circ\text{C}$ упродовж 30 секунд, КУО/см ³	0	$2 \pm 1,1$	$7 \pm 1,5$
15. Кількість бактерій <i>Cronobacter spp. (E. sakazakii)</i> після пастеризації сирого молока за температури $(72 \pm 1) ^\circ\text{C}$ упродовж 30 секунд, КУО/см ³	0	0	0

Основна наша увага була зосереджена на вивченні впливу температури та експозиції пастеризації молока вищого ґатунку з різними значеннями вмісту мікроорганізмів у ньому на залишкову кількість мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* та бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*.

Як свідчать дані таблиці 5.2, молоко вищого ґатунку із середнім значенням загальної кількості мікроорганізмів (КМАФАнМ) до 300 тис. КУО/см³ за ступенем щодо наявності в ньому

мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* та бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) поділяється на «низький», «середній» та «високий». «Низький» рівень ризику відзначається при застосуванні температури пастеризації $(62 \pm 1) ^\circ\text{C}$ упродовж 30 хвилин та $(72 \pm 1) ^\circ\text{C}$ упродовж 15 або 30 секунд.

За умови використання термічного режиму оброблення сирого молока, як гатунку «екстра», так і вищого гатунку, за температурними параметрами $(62 \pm 1) ^\circ\text{C}$ упродовж 15 хвилин кількість мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* залишається в межах від $(108 \pm 15,4)$ до $(320 \pm 18,8)$ КУО/см³. У молоці з високим вмістом мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* $(83,2 \pm 1,2)$ тис. КУО/см³ до пастеризації бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) в середньому залишалось в кількості $(87 \pm 7,2)$ КУО/см³. Остання цифра свідчить про високий ризик від використання такого молока в технології виробництва дитячих харчових продуктів.

Залишкову кількість мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* із значенням $(4 \pm 1,3)$ КУО/см³ можна віднести до середнього ризику, а залишкова кількість цих мікроорганізмів у межах до $(8 \pm 2,5)$ КУО/см³ оцінюється як високий ризик.

У цілому дані таблиць 5.1 та 5.2 свідчать про те, що в сирому молоці гатунків «екстра» та «вищий» ризик щодо контамінації бактеріями *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) готових молокопродуктів оцінюється як високий, середній та низький і залежить від початкового рівня контамінування сирого молока цими мікроорганізмами та режимів пастеризації молока. Невисокий ризик щодо бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) відзначено при застосуванні температури пастеризації молока $(62 \pm 1) ^\circ\text{C}$ упродовж 30 хвилин, $(72 \pm 1) ^\circ\text{C}$ – упродовж 15 та 30 секунд.

Характеристика ризику повинна визначатись у взаємозв'язку з визначенням факторів, що сприяють контамінації сирого молока бактеріями *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*).

Ми визначили етапи виробництва молока та проаналізували фактори, що спричиняють ризик контамінації бактеріями *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* на етапах виробництва сирого збірного молока корів (табл. 5.3).

Як бачимо з таблиці 5.3, важливими етапами виробництва сирого збірного молока корів, де можливий ризик щодо бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*, є:

- молочна ферма;
- зберігання та транспортування сирого молока;
- приймання та проміжне зберігання сирого молока на молокоприймальному пункті;
- пастеризація або дотримання термічного оброблення молока та попередження післяпастеризаційної контамінації молока.

Таблиця 5.3 – Основні фактори ризику щодо контамінації *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* на ланках виробництва сирого збірного молока корів

Ланки виробництва сирого молока	Фактори ризику	
1	2	
Молочна ферма	Фекальна контамінація	Брудна шкіра тіла та вим'я дійних корів
	Гігієнічний стан молочного обладнання	Незадовільне миття та дезінфекція, що призводить до появи біоплівки та накопичення і розмноження бактерій
	Потрапляння із зовнішнього середовища (з корму, повітря, води)	Зберігання сирого молока у відкритих ємностях
	Стан здоров'я тварин	Мастит
	Обслуговуючий персонал	брудні руки, спецодяг працівників

Продовження табл. 5.3

1	2	3
Зберігання та транспортування сирого молока	Розмноження бактерій в сирому молоці	Тривале зберігання та транспортування молока за підвищених температур (вище за +8 °С)
	Розмноження бактерій на молочному обладнанні	Незадовільне миття та дезінфекція
Приймання та проміжне зберігання сирого молока на молокоприймальному пункті	Додаткова контамінація від обладнання, яке використовується для перемішування сирого збірного молока в молоко цистерни та при відбиранні проб для лабораторного дослідження	Незадовільне миття та дезінфекція
	Додаткова контамінація від рук працівників	Незадовільне миття
	Розмноження бактерій у сирому молоці	Тривале зберігання молока за підвищених температур (+8 °С)
Пастеризація	Вживання мікроорганізмів у молоці після пастеризації	Дотримання режимів термічного оброблення
	Післяпастеризаційна контамінація	Незадовільне миття та дезінфекція технологічного обладнання

Використання результатів оцінки мікробіологічного ризику бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* для здійснення управління цими мікроорганізмами в харчовому ланцюзі виробництва сирого молока. У цьому підрозділі ми наводимо основні важелі для керування ризиком, що може спричинити бактерії *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* в харчовому ланцюзі виробництва молока. Як ці важелі ми розробили 2 варіанти мікробіологічних критеріїв: мікробіологічні критерії для певних ланок харчового ланцюга, що становлять виробничі (неофіційні) критерії та критерії, які необхідно

використовувати на офіційному рівні для контролю за рівнем санітарно-гігієнічних параметрів виробничих процесів.

Розроблення виробничих мікробіологічних критеріїв для мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* та бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) в сирому молоці. Управління мікробіологічним ризиком в харчовому ланцюзі виробництва молока повинно здійснюватися, як із боку виробника, так і з боку державної служби ветеринарної медицини. Представники державної служби ветеринарної медицини під час проведення інспектування чи аудиту ветеринарно-санітарного стану молочних ферм особливу увагу повинні приділяти питанню щодо встановлення відповідності виробництва до встановлених ветеринарно-санітарних вимог для забезпечення санітарних норм молока. Оскільки виробник молока відповідає за показники безпечності свого продукту, він повинен мати надійні засоби для того, щоб управляти цими показниками безпечності. Найбільш признаним засобом управління небезпечними чинниками при виробництві продовольчої сировини та харчових продуктів є система НАССР, в якій управління здійснюється в КТК. Щоб КТК знаходилася під управлінням, на цій точці виставляють конкретні параметри, яких необхідно дотримуватися. Згідно з нашими дослідженнями, одним із показників безпечності молока, особливо такого молока, що йде на виробництво продуктів дитячого харчування, є бактерії *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*).

Крім того, ми встановили, що ці бактерії не завжди виявляються в сирому збірному молоці корів, але мікроорганізми родини *Enterobacteriaceae*, до якої відносять бактерії *E. sakazakii*, завжди є в складі МАФАНМ. Тобто наявність мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* може бути індикатором щодо можливої наявності бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) в сирому молоці. Щоб більш точно передбачати можливість наявності бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) в сирому молоці, ми підрахували співвідношення цих мікроорганізмів, яке можна використовувати для встановлення ймовірності наявності цих бактерій у ньому. Використання

співвідношень бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* до мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* проводиться залежно до мети, яку ставить виробник молока.

Так, наприклад, якщо мета виробника – виробляти молоко гатунку «екстра», то він повинен орієнтуватися на одні значення, а з метою вироблення молока вищого чи першого гатунку – інші. У зв'язку з тим, що ми особливу увагу акцентували на молоці найвищих гатунків, тому сформували відповідно дві мети для виробників стосовно мікробіологічних показників:

1) мета перша – для виробництва молока гатунку «екстра»: виробляти молоко, в якому загальна кількість мікроорганізмів (КМАФАнМ) менша ніж 100 тис. КУО/см³;

2) мета друга – для виробництва молока гатунку «вищий»: виробляти молоко, в якому загальна кількість мікроорганізмів (КМАФАнМ) менша ніж 300 тис. КУО/см³.

Але, крім загальної кількості мікроорганізмів, для молока вищих гатунків дуже важливо визначити мету стосовно таких мікроорганізмів, як мікроорганізми родини *Enterobacteriaceae*, що було визначено в попередньому розділі.

Щоб досягнути поставленої мети щодо мікробіологічних показників молока, виробник повинен мати виробничі мікробіологічні орієнтири.

У цьому розділі подано результати розроблення виробничих мікробіологічних орієнтирів – критеріїв, які ми позначили англійськими літерами згідно з міжнародними позначеннями – РО.

Виробник на кожній КТК повинен мати конкретні значення РО, що розробляються спільно з науковцями. Виробник, маючи конкретні значення мікробіологічних показників у певних ланках виробничого процесу, повинен досягати цих значень шляхом конкретних дій, тобто критеріїв щодо виконання РО, які на міжнародному рівні позначаються англійськими літерами РС.

Ми також розробили параметри, що забезпечують виконання виробником мікробіологічних критеріїв. Ці параметри називають «критерії

виконання» або «параметри виконання» (РС) . Як критерії РО, так і критерії РС для виробника є орієнтирами на певних виробничих процесах упродовж харчового ланцюга виробництва сирого молока для досягнення конкретної мети. Використання цих параметрів також необхідне для того, щоб досягнути показників безпечності, встановлених офіційно на рівні держави.

Під час проведення офіційного контролю державною службою ветеринарної медицини здійснюється перевірка дотримання виробником виробничих мікробіологічних критеріїв. Такий підхід застосовується в країнах ЕС та СОТ, що сприяє гарантованому виробництву високоякісних та безпечних харчових продуктів і базується на застосуванні проміжних – виробничих мікробіологічних критеріїв – РО та критеріїв виконання – РС.

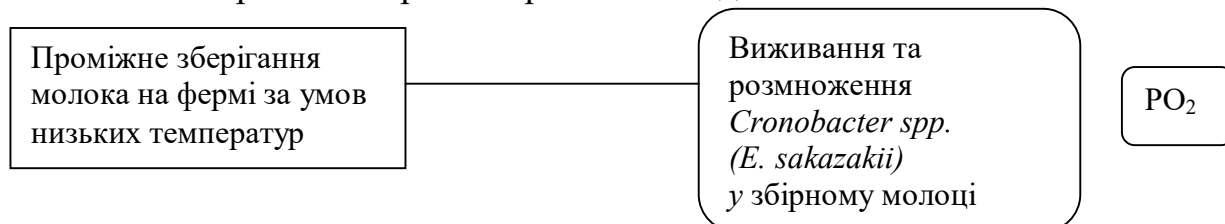
При встановленні виробничих мікробіологічних критеріїв ми керувалися такими самими положеннями, що й були одержані за результатами наших попередніх досліджень: якщо бактерії *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* наявності в сирому збірному молоці корів, то вони можуть розмножуватися навіть за низьких температур при його зберіганні, високому вмісті білка, проте метою пригнічуються високим вмістом жиру та високою кислотністю. Для розроблення межових значень виробничих мікробіологічних параметрів для виробництва молока, ми виділили такі ланки, в яких ймовірність може бути контамінування вищезазначеними мікроорганізмами, і в зв'язку з цим необхідно проводити в цих ланках контроль із боку виробника.

Ми визначили такі КТК харчового ланцюга: КТК № 1 «Сире збірне неохолоджене молоко»; КТК № 2 «Зберігання сирого збірного охолодженого молока»; КТК № 3 «Транспортування сирого збірного охолодженого молока»; КТК № 4 «Пастеризація сирого збірного молока». Кожна з цих ланок визнані як КТК шляхом проведення аналізу ризиків із використанням «дерева рішень» системи НАССР. Схематично ці ланки подані на нижченаведеному рисунку 5.1.

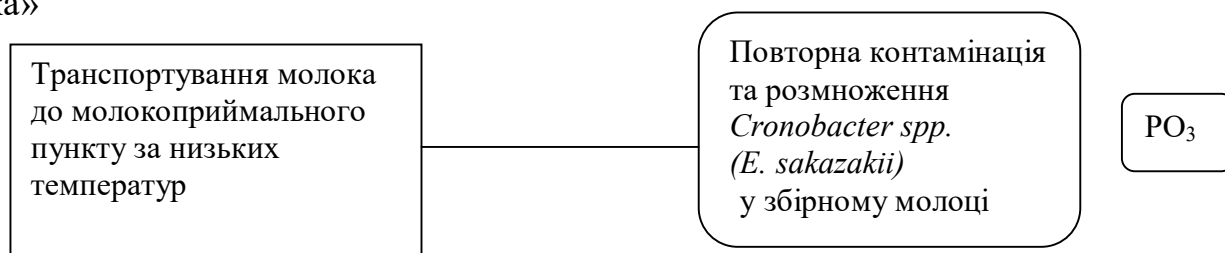
КТК № 1 «Сире збірне неохолоджене молоко»



КТК № 2 «Зберігання сирого збірного охолодженого молока»



КТК № 3 «Транспортування та приймання сирого збірного охолодженого молока»



КТК № 4 «Пастеризація сирого збірного молока»

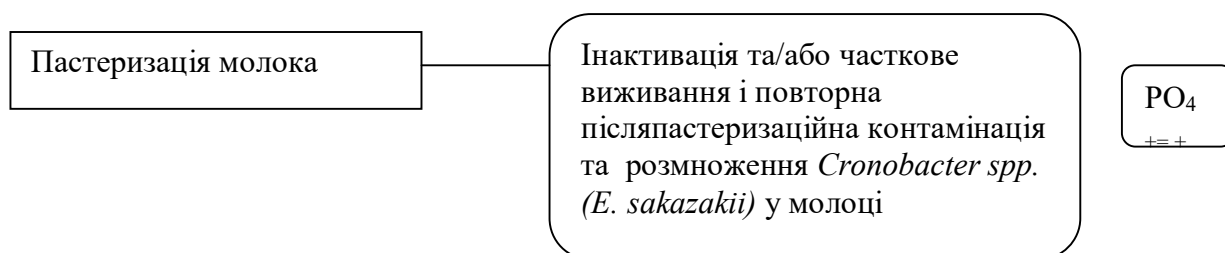


Рисунок 5.1 – Харчовий ланцюг виробництва сирого молока

Нижче наводимо приклад розрахунку РО для охолодженого молока гатунку екстра, за умови зберігання на молочній фермі за температури 4 °С упродовж 24 годин та транспортуванні упродовж 60 хвилин до молокоприймального пункту.

Оскільки метою виробника є виробляти молоко гатунку «екстра», то цільові виробничі мікробіологічні орієнтири на момент здавання молока охолодженого на молокопереробне підприємство повинні бути $PO_{\text{КМАФАНМ}} \leq 100$ тис. КУО/см³ щодо КМАФАНМ.

Ми визначили межі РО для кожної ланки виробництва окремо стосовно КМАФАНМ, мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* та бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*, виходячи з власних результатів лабораторних досліджень. Зведена таблиця даних для цього розрахунку наведена в таблиці 5.4.

Таблиця 5.4 – Зведені дані власних досліджень, необхідні для розрахунку значень РО в ланках виробництва сирого збірного молока гатунку «екстра»

Показник	Значення показників
1	2
Кількість МАФАНМ у збірному молоці неохолодженому, тис. КУО/см ³	58 ± 1,7
Кількість МАФАНМ у збірному охолодженому молоці при зберіганні його за температури 4 °С, упродовж 24 годин, тис. КУО/см ³	63 ± 13,7
Кількість МАФАНМ у збірному охолодженому молоці після його транспортування впродовж 60 хвилин, тис. КУО/см ³	69 ± 9,7
Кількість мікроорганізмів родини <i>Enterobacteriaceae</i> у збірному неохолодженому молоці, тис. КУО/см ³	5,8 ± 0,1

Продовження табл. 5.4

1	2
Кількість мікроорганізмів родини <i>Enterobacteriaceae</i> в збірному охолодженому молоці при зберіганні його за температури 4 °С, упродовж 24 годин, тис. КУО/см ³	8,8 ± 1,7
Кількість мікроорганізмів родини <i>Enterobacteriaceae</i> в збірному охолодженому молоці після його транспортування впродовж 60 хвилин, тис. КУО/см ³	9,9 ± 1,8
Кількість бактерій <i>Cronobacter spp. (E. sakazakii)</i> в збірному неохолодженому молоці, КУО/см ³	3 ± 1
Кількість бактерій <i>Cronobacter spp. (E. sakazakii)</i> в збірному молоці охолодженому при зберіганні його за температури 4 °С, впродовж 24 годин, КУО/см ³	8 ± 2,3
Кількість бактерій <i>Cronobacter spp. (E. sakazakii)</i> в збірному молоці охолодженому після його транспортування впродовж 60 хвилин, КУО/см ³	10 ± 4,3

Необхідно зазначити, що показник РО для кожної ланки різний, а також він може різнитися в кожній конкретній ланці і залежить від параметрів молока і параметрів його зберігання. Тобто показник РО в межах кожної ланки визначається з урахуванням конкретних показників.

Для розрахунків параметрів РО використовували формулу (5.1):

$$H_0 + \Sigma I - \Sigma R \leq PO_n, \quad (5.1)$$

де H_0 – вихідний рівень середньої концентрації мікроорганізмів у сирому молоці;

ΣI – показник збільшення середньої концентрації мікроорганізмів у сирому молоці (внаслідок збільшення кількості (розмноження) бактеріальних клітин та потрапляння бактерій із довкілля (молочне обладнання, повітря тощо);

ΣR – показник зменшення середньої концентрації мікроорганізмів у сирому молоці (вплив низької температури та вплив параметрів молока (жир, кислотність).

Розрахунок значень PO для $KMA\Phi A_{HM}$ ($PO_{KMA\Phi A_{HM}}$)

Розрахунки проводили у зворотному напрямку, починаючи з ланки № 3 «Транспортування та приймання сирого збірною охолодженого молока» (рис. 5.4). Згідно з ДСТУ 3662-97 кількість $MA\Phi A_{HM}$ у сирому збірному охолодженому молоці гатунку «екстра» повинно становити ≤ 100 тис. КУО/см³. Це і є значенням для $PO_{KMA\Phi A_{HM}}$ в ланці № 3. У цьому випадку формула (5.1) набирає вигляду

$$H_{0-3\ KMA\Phi A_{HM}} + \Sigma I_{3\ KMA\Phi A_{HM}} - \Sigma R_{3\ KMA\Phi A_{HM}} \leq PO_{3\ KMA\Phi A_{HM}},$$

або

$$H_{0-3\ KMA\Phi A_{HM}} + \Sigma I_{3\ KMA\Phi A_{HM}} - \Sigma R_{3\ KMA\Phi A_{HM}} \leq 100\ 000.$$

Ми встановили, що за умови транспортування охолодженого молока гатунку «екстра», яке попередньо зберігалось на фермі охолодженим за температури 4 °С упродовж 24 годин, до молокоприймального пункту упродовж 60 хвилин кількість $MA\Phi A_{HM}$ збільшувалася в середньому на 6 тис. КУО/см³: $(69 \pm 9,7) - (63 \pm 13,7) = 6$, тобто показник збільшення середньої кількості $MA\Phi A_{HM}$ ($\Sigma I_{3\ KMA\Phi A_{HM}}$) буде дорівнювати 6 тис. КУО/см³.

Показник зменшення середньої кількості $MA\Phi A_{HM}$ ($\Sigma R_{3\ KMA\Phi A_{HM}}$) у цьому випадку дорівнює 0, оскільки зменшення цієї групи мікроорганізмів не відзначено. Звідси формула (5.1) набирає такого вигляду:

$$H_{0-3\ KMA\Phi A_{HM}} + 6\ 000 - 0 \leq 100\ 000,$$

$$H_{0-3\ KMA\Phi A_{HM}} \leq 100\ 000 - 6\ 000 \leq 96\ 000.$$

Отже, як бачимо з розрахунків, вихідний рівень середньої кількості МАФАНМу сирому охолодженому молоці гатунку «екстра» до транспортування повинен становити менше або дорівнювати 96 000 КУО/см³. А вихідний рівень показника $H_{0-3 \text{ КМАФАнМ}}$ є кінцевим значенням для попередньої ланки виробництва молока, якою є ланка № 2 «Зберігання сирого збірною охолодженого молока» (рис. 5.1). Тобто $H_{0-3 \text{ КМАФАнМ}} = PO_{2 \text{ КМАФАнМ}} \leq \leq 96 000 \text{ КУО/см}^3$.

Тепер проведемо розрахунки для ланки № 2 «Зберігання сирого збірною охолодженого молока», при цьому загальна формула (5.1) буде мати такий вигляд:

$$H_{0-2 \text{ КМАФАнМ}} + \Sigma I_{2 \text{ КМАФАнМ}} - \Sigma R_{2 \text{ КМАФАнМ}} \leq PO_{2 \text{ КМАФАнМ}},$$

або

$$H_{0-2 \text{ КМАФАнМ}} + \Sigma I_{2 \text{ КМАФАнМ}} - \Sigma R_{2 \text{ КМАФАнМ}} \leq 96 000.$$

У цьому випадку показник збільшення середньої кількості МАФАНМ ($\Sigma I_{2 \text{ КМАФАнМ}}$) буде дорівнювати різниці кількості МАФАНМ у молоці до охолодження та кількості МАФАНМ після зберігання молока охолодженим. Тобто $\Sigma I_{2 \text{ КМАФАнМ}} = (63 \pm 13,7) - (58 \pm 1,7) = 5 \text{ тис. КУО/см}^3$.

Показник зменшення середньої кількості МАФАНМ ($\Sigma R_{2 \text{ КМАФАнМ}}$) у цьому випадку дорівнює 0, оскільки зменшення цієї групи мікроорганізмів не відзначено. Звідси

$$H_{0-2 \text{ КМАФАнМ}} + 5 000 - 0 \leq 96 000,$$

$$H_{0-2 \text{ КМАФАнМ}} \leq 96 000 - 5 000 \leq 91 000.$$

Отже, як бачимо з розрахунків, вихідний рівень середньої кількості МАФАНМ в сирому охолодженому молоці гатунку «екстра» до охолодження повинен становити менше або дорівнює 91 000 КУО/см³. Значення $H_{0-2 \text{ КМАФАнМ}}$ є кінцевим значенням для попередньої ланки виробництва молока, якою є ланка

№ 1 «Сире збірне неохолоджене молоко» (рис. 5.1). Тобто $N_{0-2 \text{ КМАФАнМ}} = PO_{1 \text{ КМАФАнМ}} \leq 91\,000 \text{ КУО/см}^3$.

Підсумовуючи розрахунки $PO_{\text{КМАФАнМ}}$ для охолодженого молока гатунку «екстра», за умов зберігання на молочній фермі за температури 4 °С упродовж 24 годин та транспортування впродовж 60 хвилин до молокоприймального пункту маємо:

Ланка № 1 «Сире збірне неохолоджене молоко»:

$$PO_{1\text{КМАФАнМ}} \leq 91 \text{ тис. КУО/см}^3.$$

Ланка № 2 «Зберігання сирого збірного охолодженого молока»:

$$PO_{2\text{КМАФАнМ}} \leq 96 \text{ тис. КУО/см}^3.$$

Ланка № 3 «Транспортування та приймання сирого збірного охолодженого молока»:

$$PO_{3\text{КМАФАнМ}} \leq 100 \text{ тис. КУО/см}^3.$$

Розрахуємо $PO_{4\text{КМАФАнМ}}$ для ланки № 4 «Пастеризація сирого збірного молока» на прикладі застосування температури пастеризації 72 °С упродовж 15 секунд. На цьому етапі формула буде мати інший вигляд, оскільки показник збільшення середньої кількості МАФАнМ у сирому охолодженому молоці під час пастеризації дорівнює 0 ($\Sigma I = 0$), а показник $PO_{3 \text{ КМАФАнМ}}$ є вихідним рівнем ($N_{0-4 \text{ КМАФАнМ}}$) для розрахунку $PO_{4 \text{ КМАФАнМ}}$ або $N_{0-4 \text{ КМАФАнМ}} = PO_{3 \text{ КМАФАнМ}}$, то формула (5.1) має такий вигляд:

$$N_{0-4 \text{ КМАФАнМ}} + \Sigma I_{4 \text{ КМАФАнМ}} - \Sigma R_{4 \text{ КМАФАнМ}} \leq PO_{4 \text{ КМАФАнМ}},$$

або

$$100\,000 + 0 - \Sigma R_{4 \text{ КМАФАнМ}} \leq PO_{4 \text{ КМАФАнМ}}.$$

Згідно з нашими даними ефективність пастеризації за температури пастеризації 72 °С упродовж 15 секунд щодо КМАФАнМ у середньому становить 96,8 %. Тому середній показник зменшення кількості МАФАнМ ($\Sigma R_{4\text{КМАФАнМ}}$) під час пастеризації згідно з розрахунками буде становити

$$100\,000 - 100 \%,$$

$$X - 96,8 \%, \quad X = \Sigma R_{4 \text{ КМАФАнМ}} = 96\,800.$$

Підставляємо значення у формулу і маємо:

$$100\,000 + 0 - 96\,800 \leq PO_{4 \text{ КМАФАнМ}},$$

$$PO_{4 \text{ КМАФАнМ}} \leq 3\,200 \text{ КУО/см}^3.$$

Отже, $PO_{\text{КМАФАнМ}}$ для ланки № 4 «Пастеризація сирого збірною молока» згідно з нашими розрахунками становить $3\,200 \text{ КУО/см}^3$.

Розрахунок значень РО для мікроорганізмів родини

Enterobacteriaceae ($PO_{\text{Enterobacteriaceae}}$)

Як і у випадку з розрахунком РО для КМАФАнМ ($PO_{\text{КМАФАнМ}}$), розрахунки РО мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* ($PO_{\text{Enterobacteriaceae}}$) проводили у зворотному напрямку, починаючи з ланки №3 «Транспортування та приймання сирого збірною охолодженого молока». Згідно з нашими дослідженнями середня відносна кількість мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* в сирому збірному молоці ґатунку «екстра» становить 19,9 % до кількості МАФАнМ. Тому абсолютна їх кількість в $100\,000 \text{ КУО/см}^3$ МАФАнМ буде становити в середньому $19\,900 \text{ КУО/см}^3$. Це і є значенням для $PO_{\text{Enterobacteriaceae}}$ у ланці № 3, тому формула (5.1) має вигляд

$$H_{0-3 \text{ Enterobacteriaceae}} + \Sigma I_{3 \text{ Enterobacteriaceae}} - \Sigma R_{3 \text{ Enterobacteriaceae}} \leq PO_{3 \text{ Enterobacteriaceae}},$$

або

$$H_{0-3 \text{ Enterobacteriaceae}} + \Sigma I_{3 \text{ Enterobacteriaceae}} - \Sigma R_{3 \text{ Enterobacteriaceae}} \leq 19\,900.$$

Ми встановили, що за умови транспортування охолодженого молока ґатунку «екстра», яке попередньо зберігали на фермі охолодженим за температури $4 \text{ }^\circ\text{C}$ упродовж 24 годин, до молокоприймального упродовж 60 хвилин пункту, кількість мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* збільшувалася в середньому на 3 тис. КУО/см^3 : $(9,9 \pm 1,8) - (8,8 \pm 1,7) = 1,1$, тобто показник збільшення середньої кількості мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* ($\Sigma I_{3 \text{ Enterobacteriaceae}}$) буде дорівнювати $1\,100 \text{ КУО/см}^3$.

Показник зменшення середньої кількості ΣR_3 *Enterobacteriaceae* у цьому випадку дорівнює 0, оскільки зменшення цієї групи мікроорганізмів не відзначено. Звідси формула (5.1) набирає такого вигляду:

$$N_{0-3} \text{ Enterobacteriaceae} + 1\ 100 - 0 \leq 19\ 900,$$

$$N_{0-3} \text{ Enterobacteriaceae} \leq 19\ 900 - 1\ 100 \leq 18\ 800.$$

Отже, як бачимо з вищенаведених розрахунків, вихідний рівень середньої кількості мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* в сирому охолодженому молоці гатунку «екстра» до транспортування повинен бути меншим або дорівнювати 16 900 КУО/см³. А вихідний рівень показника $N_{0-3} \text{ Enterobacteriaceae}$ є кінцевим значенням для ланки № 2 «Зберігання сирого збірною охолодженого молока». Тобто $N_{0-3} \text{ Enterobacteriaceae} = PO_2 \text{ Enterobacteriaceae} \leq 18\ 800$ КУО/см³.

Тепер проведемо розрахунки для ланки № 2 «Зберігання сирого збірною охолодженого молока», при цьому загальна формула (5.1) буде мати такий вигляд:

$$N_{0-2} \text{ Enterobacteriaceae} + \Sigma I_2 \text{ Enterobacteriaceae} - \Sigma R_2 \text{ Enterobacteriaceae} \leq PO_2 \text{ Enterobacteriaceae},$$

або

$$N_{0-2} \text{ Enterobacteriaceae} + \Sigma I_2 \text{ Enterobacteriaceae} - \Sigma R_2 \text{ Enterobacteriaceae} \leq 18\ 800.$$

У цьому випадку показник збільшення середньої кількості мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* ($\Sigma I_2 \text{ Enterobacteriaceae}$) буде дорівнювати різниці кількості мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* в молоці до охолодження та кількості мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* після зберігання молока охолодженим. Тобто $\Sigma I_2 \text{ Enterobacteriaceae} = (8,8 \pm 1,7) - (5,8 \pm 0,1) = 3$ тис. КУО/см³.

Показник зменшення середньої кількості мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* ($\Sigma R_2 \text{ Enterobacteriaceae}$) в цьому випадку дорівнює 0, оскільки зменшення цієї групи мікроорганізмів не відзначено. Звідси:

$$N_{0-2} \text{ Enterobacteriaceae} + 3\ 000 - 0 \leq 18\ 800,$$

$$N_{0-2} \text{ Enterobacteriaceae} \leq 18\ 800 - 3\ 000 \leq 15\ 800.$$

Отже, як бачимо з розрахунків, вихідний рівень середньої кількості мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* (N_{0-2} *Enterobacteriaceae*) в сирому охолодженому молоці гатунку «екстра» до охолодження повинен становити менше або дорівнювати $15\,800$ КУО/см³. Значення N_{0-2} *Enterobacteriaceae* є кінцевим значенням для попередньої ланки виробництва молока, якою є ланка № 1 «Сире збірне неохолоджене молоко» (рис. 3.26). Тобто

$$N_{0-2} \text{ Enterobacteriaceae} = PO_1 \text{ Enterobacteriaceae} \leq 15\,800 \text{ КУО/см}^3.$$

Підсумовуючи розрахунки $PO_{\text{Enterobacteriaceae}}$ для охолодженого молока гатунку «екстра», за умов зберігання на молочній фермі за температури $4\text{ }^\circ\text{C}$, упродовж 24 годин та транспортування впродовж 60 хвилин до молокоприймального пункту, маємо:

Ланка № 1 «Сире збірне неохолоджене молоко»:

$$PO_1 \text{ Enterobacteriaceae} \leq 15\,800 \text{ КУО/см}^3.$$

Ланка № 2 «Зберігання сирого збірного охолодженого молока»:

$$PO_2 \text{ Enterobacteriaceae} \leq 18\,800 \text{ КУО/см}^3.$$

Ланка № 3 «Транспортування та приймання сирого збірного охолодженого молока»:

$$PO_3 \text{ Enterobacteriaceae} \leq 19\,900 \text{ КУО/см}^3.$$

Розрахуємо PO_4 *Enterobacteriaceae* для ланки № 4 «Пастеризація сирого збірного молока» на прикладі застосування температури пастеризації $72\text{ }^\circ\text{C}$ упродовж 15 секунд. На цьому етапі формула буде мати інший вигляд, оскільки показник збільшення середньої кількості мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* в сирому охолодженому молоці під час пастеризації дорівнює 0 ($\Sigma I = 0$), а показник PO_3 *Enterobacteriaceae* є вихідним рівнем (N_{0-4} *Enterobacteriaceae*) для розрахунку PO_4 *Enterobacteriaceae* або N_{0-4} *Enterobacteriaceae* = PO_3 *Enterobacteriaceae*, то формула (5.1) має такий вигляд:

$$N_{0-4} \text{ Enterobacteriaceae} + \Sigma I_4 \text{ Enterobacteriaceae} - \Sigma R_4 \text{ Enterobacteriaceae} \leq PO_4 \text{ Enterobacteriaceae},$$

або

$$19\,900 + 0 - \Sigma R_4 \text{ Enterobacteriaceae} \leq PO_4 \text{ Enterobacteriaceae}.$$

Згідно з нашими даними ефективність пастеризації за температури пастеризації 72 °С упродовж 15 секунд щодо мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* становить 96,5 %. Тому середній показник зменшення кількості мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* (ΣR_4 *Enterobacteriaceae*) під час пастеризації згідно з розрахунками буде становити:

$$19\,900 - 100\%,$$

$$X - 96,5\%, \quad X = \Sigma R_4 \text{ Enterobacteriaceae} = 19\,204.$$

Підставляємо значення у формулу і маємо:

$$19\,900 + 0 - 19\,204 \leq PO_4 \text{ Enterobacteriaceae}$$

$$PO_4 \text{ Enterobacteriaceae} \leq 697 \text{ КУО/см}^3.$$

Отже, $PO_{\text{Enterobacteriaceae}}$ для ланки № 4 «Пастеризація сирого збірного молока» згідно з нашими розрахунками становить 697 КУО/см³.

Розрахунок значень PO для бактерій *Enterobacter sakazakii*

($PO_{E. sakazakii}$)

Як і у випадку з розрахунками $PO_{\text{КМАФАнМ}}$ та $PO_{\text{Enterobacteriaceae}}$, розрахунок PO для бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* ($PO_{E. sakazakii}$) проводили починаючи з ланки № 3 «Транспортування та приймання сирого збірного охолодженого молока» (рис. 3.26). Згідно з нашими попередніми дослідженнями, що наведені в цьому розділі, середня кількість бактерій *Enterobacter sakazakii* в сирому збірному молоці ґатунку «екстра» становить $(124 \pm 21,4)$ КУО/см³. Це і є значенням для $PO_{\text{Cronobacter spp. (E. sakazakii)}}$ в ланці № 3, тому формула (5.1) має вигляд

$$H_{0-3} \text{ Cronobacter spp. (E. sakazakii)} + \Sigma I_3 E. sakazakii - \Sigma R_3 E. sakazakii \leq PO_3 E. sakazakii,$$

або

$$H_{0-3E. sakazakii} + \Sigma I_3 E. sakazakii - \Sigma R_3 \text{ Cronobacter spp. (E. sakazakii)} \leq 124.$$

Ми встановили, що за умови транспортування охолодженого молока ґатунку «екстра», яке попередньо зберігалось на фермі охолодженим за температури 4 °С упродовж 24 годин, до молокоприймального пункту

упродовж 60 хвилин кількість бактерій *Enterobacter sakazakii* збільшувалася в середньому на 2 КУО/см³: $(10 \pm 4,3) - (8 \pm 2,3) = 2,2$, тобто показник збільшення середньої кількості бактерій *Enterobacter sakazakii* ($\Sigma I_3 E. sakazakii$) буде дорівнювати 2 КУО/см³.

Показник зменшення середньої кількості $\Sigma R_3 E. sakazakii$ в цьому випадку дорівнює 0, оскільки зменшення цієї групи мікроорганізмів не відзначено. Звідси формула (5.1) набирає такого вигляду:

$$N_{0-3 E. sakazakii} + 2 - 0 \leq 124,$$

$$N_{0-3 E. sakazakii} \leq 124 - 2 \leq 122.$$

Отже, як бачимо з вищенаведених розрахунків, вихідний рівень середньої кількості бактерій *Enterobacter sakazakii* в сирому охолодженому молоці гатунку «екстра» до транспортування повинен бути меншим або дорівнювати 122 КУО/см³. А вихідний рівень показника $N_{0-3 E. sakazakii}$ є кінцевим значенням для ланки № 2 «Зберігання сирого збірного охолодженого молока». Тобто $N_{0-3 E. sakazakii} = PO_{2 E. sakazakii} \leq 18\ 800$ КУО/см³.

Тепер проведемо розрахунки для ланки № 2 «Зберігання сирого збірного охолодженого молока», при цьому загальна формула (5.1) буде мати такий вигляд:

$$N_{0-2 E. sakazakii} + \Sigma I_2 E. sakazakii - \Sigma R_2 E. sakazakii \leq PO_{2 E. sakazakii}$$

або

$$N_{0-2 E. sakazakii} + \Sigma I_2 E. sakazakii - \Sigma R_2 E. sakazakii \leq 122.$$

У цьому випадку показник збільшення середньої кількості бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* ($\Sigma I_2 E. sakazakii$) буде дорівнювати різниці кількості бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* в молоці до охолодження та кількості бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* після зберігання молока охолодженим. Тобто $\Sigma I_2 E. sakazakii = (8 \pm 2,3) - (3 \pm 1) = 5,1$ КУО/см³.

Показник зменшення середньої кількості бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* ($\Sigma R_2 E. sakazakii$) в цьому випадку дорівнює 0, оскільки зменшення цієї групи мікроорганізмів не відзначено. Звідси:

$$N_{0-2 E. sakazakii} + 5 - 0 \leq 122,$$

$$N_{0-2 E. sakazakii} \leq 122 - 5 \leq 117.$$

Отже, як бачимо з розрахунків, вихідний рівень середньої кількості бактерій *Enterobacter sakazakii* ($N_{0-2 E. sakazakii}$) в сирому охолодженому молоці гатунку «екстра» до охолодження повинен становити менше або дорівнювати 117 КУО/см³. Значення $N_{0-2 E. sakazakii}$ є кінцевим значенням для попередньої ланки виробництва молока, якою є ланка № 1 «Сире збірне неохолоджене молоко». Тобто $N_{0-2 E. sakazakii} = PO_{1 E. sakazakii} \leq 117$ КУО/см³.

Підсумовуючи розрахунки $PO_{Cronobacter spp. (E. sakazakii)}$ для охолодженого молока гатунку «екстра», за умов зберігання на молочній фермі за температури 4 °С, упродовж 24 годин та транспортування впродовж 60 хвилин до молокоприймального пункту, маємо:

КТК № 1 «Сире збірне неохолоджене молоко»:

$$PO_{1 E. sakazakii} \leq 124 \text{ КУО/см}^3.$$

КТК № 2 «Зберігання сирого збірного охолодженого молока»:

$$PO_{2 E. sakazakii} \leq 122 \text{ КУО/см}^3.$$

КТК № 3 «Транспортування та приймання сирого збірного охолодженого молока»:

$$PO_{3 E. sakazakii} \leq 117 \text{ КУО/см}^3.$$

Розрахунки $PO_{4 Cronobacter spp. (E. sakazakii)}$ для ланки № 4 «Пастеризація сирого збірного молока» на прикладі застосування температури пастеризації 72 °С упродовж 15 секунд не проводили. Оскільки, згідно з нашими даними ефективність пастеризації за температури пастеризації 72 °С упродовж 15 секунд щодо бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* становить 100 % (табл. 3.30). Тому, показник $PO_{4 Cronobacter spp. (E. sakazakii)}$ дорівнює 0.

Підсумок проведених підрахунків виробничих критеріїв для збірного молока корів гатунку «екстра» наведено на рис. 5.2.

КТК № 1 «Сире збірне неохолоджене молоко»

$$PO_1 \text{ КМАФАнМ} \leq 91\,000 \text{ КУО/см}^3,$$

$$PO_1 \text{ Enterobacteriaceae} \leq 15\,800 \text{ КУО/см}^3,$$

$$PO_1 \text{ E. sakazakii} \leq 117$$

КТК № 2 «Зберігання сирого збірною охолодженого молока»

$$PO_2 \text{ КМАФАнМ} \leq 96\,000 \text{ КУО/см}^3,$$

$$PO_2 \text{ Enterobacteriaceae} \leq 18\,800 \text{ КУО/см}^3,$$

$$PO_2 \text{ E. sakazakii} \leq 122$$

КТК № 3 «Транспортування та приймання збірною охолодженого молока»

$$PO_3 \text{ КМАФАнМ} \leq 100\,000 \text{ КУО/см}^3,$$

$$PO_3 \text{ Enterobacteriaceae} \leq 19\,900 \text{ КУО/см}^3,$$

$$PO_3 \text{ E. sakazakii} \leq 124 \text{ КУО/см}^3$$

КТК № 4 «Пастеризація сирого збірною молока»

$$PO_4 \text{ КМАФАнМ} \leq 3\,200 \text{ КУО/см}^3,$$

$$PO_4 \text{ Enterobacteriaceae} \leq 100 \text{ КУО/см}^3,$$

$$PO_4 \text{ E. sakazakii} \leq 0 \text{ КУО/см}^3$$

Рисунок 5.2 – Значення виробничих мікробіологічних критеріїв (PO) для МАФАнМ, мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* та бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) при виробництві молока гатунку «екстра»

Отже, як бачимо з вищенаведених даних, у перших трьох ланках виробництва сирого збірною молока гатунку «екстра» є ймовірність

збільшення середньої кількості МАФАНМ, мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* та бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* в сирому охолодженому молоці (Σ), а зменшення (МАФАНМ, мікроорганізми родини *Enterobacteriaceae*) або повне знищення (бактерії *Enterobacter sakazakii*) їх кількості відзначається під час його пастеризації. Поява бактерій *Enterobacter sakazakii* в готових продуктах дітей може пояснюватися порушенням режиму пастеризації молока або повторною контамінацією під час виробничого процесу.

У підрозділі були визначені виробничі критерії стосовно мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* та бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* для застосування виробником на ключових ланках харчового ланцюга виробництва молока. Ці ланки ідентифікувались як критичні точки управління за системою НАССР. Зазначені виробничі критерії РО ми розраховали експериментально. Призначення зазначених критеріїв – допомогти виробнику гарантовано виробляти молоко, яке за мікробіологічними критеріями відповідає гатункам «екстра» та «вищий». Значення виробничих критеріїв щодо таких індикаторних мікробіологічних показників, як мікроорганізми родини *Enterobacteriaceae* та бактерії *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*, були встановлені з таким розрахунком, щоб під час приймання на молокопереробному підприємстві в сирому збірному молоці зазначені мікроорганізми були в тих межах, що не мають високого ризику для споживачів.

Розроблення виробничих критеріїв виконання – РС для контролю мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* та бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* при виробництві сирого молока. У попередніх розділах на підставі одержаних експериментальних даних ми розробили мікробіологічні критерії для КТК у ланках харчового ланцюга виробництва молока, що являють собою межові значення кількості мікроорганізмів, які дещо нижчі від тих рівнів, що становлять ризик і тому за умови дотримання цих критеріїв на заключній ланці виробник може гарантувати належні мікробіологічні

показники. Для того, щоб досягти виконання виробничих мікробіологічних критеріїв, необхідно використовувати засоби керування цими показниками. До таких засобів керування (контролю) відносять дії, спрямовані на дотримання певних технологічних операцій показників продукції, та вмінь і знань робочого персоналу.

Для виробничих мікробіологічних критеріїв (РО), які ми визначили, до таких засобів керування (РС) віднесені: параметри охолодження молока, параметри пастеризації молока, параметри фізико-хімічних показників молока.

КТК № 1 «Сире збірне неохолоджене молоко»:

РС₁ – дотримуватися вимог належної гігієнічної практики на фермі.

КТК № 2 «Зберігання сирого збірного охолодженого молока»:

РС₂ – дотримуватися вимог належної гігієнічної практики під час зберігання;

РС₂ – підтримувати рівень температури охолодженого молока в межах від 4 до 8 °С;

РС₂ – зберігати охолоджене молоко не більше ніж 48 год.

КТК № 3 «Транспортування та приймання збірного охолодженого молока»:

РС₃ – дотримуватися вимог належної гігієнічної практики під час транспортування;

РС₃ – підтримувати рівень температури охолодженого молока в межах від 4 до 8 °С;

РС₃ – транспортувати молоко охолоджене не більше ніж 1 год.

КТК № 4 «Пастеризація сирого збірного молока»:

PC₄ – дотримуватися вимог належної гігієнічної практики під час пастеризації;

PC₄ – підтримувати температуру пастеризації на рівні, не нижчому ніж (72 ± 1) °C;

PC₄ – підтримувати експозицію пастеризації 15 або 30 секунд.

Визначення офіційних мікробіологічних критеріїв при виробництві сирого молока. Одне з основних завдання державної служби ветеринарної медицини в галузі ветеринарно-санітарного контролю виробництва продовольчої сировини тваринного походження полягає в тому, щоб допомогти виробникові розробити належну внутрішню систему контролю та слідкувати за належним виконанням усіх заходів щодо управління в критичних точках контролю. Належний контроль у критичних точках керування (КТК) з боку виробника буде ефективним лише в тому випадку, коли в КТК будуть установлені адекватні критичні межі та будуть розроблені моніторингові процедури і заходи на випадок відхилення значень від установлених параметрів. Упровадження внутрішнього контролю, що базується на системі НАССР, не легке завдання для виробника, в зв'язку з чим повинна бути допомога з боку державної служби ветеринарної медицини. Контроль за безпечним виробництвом молока необхідно проводити на постійній основі з певною систематичністю. Наші дослідження дають можливість організувати чіткий контроль виробника за виконанням ним певних виробничих мікробіологічних критеріїв.

Наші дослідження спрямовані на попередження мікробіологічного ризику від бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) при виробництві молока сирого збірного для дитячого харчування. Як було зазначено вище, основна увага з боку виробника повинна бути зосереджена на чотирьох основних КТК, завершальною з яких є пастеризація. Ефективність пастеризації, як свідчать дані таблиць 3.30 та 3.31, залежить від двох основних чинників – початкової

контамінації мікроорганізмами сирого збірного молока та дотримання режимів пастеризації. За недостатньої пастеризації сирого збірного молока – нижче ніж $(72 \pm 1) ^\circ\text{C}$ – існує можливість виживання в ньому таких мікроорганізмів, як бактерії *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*). Для встановлення виробничих мікробіологічних критеріїв у ланцюгу виробництва молока найвищих гатунків ми пропонуємо впроваджувати показники, зазначені в розділах вище. Схематично логіку застосування виробничих параметрів, таких як РО та РС, а також значення системи НАССР, передано на схемі 5.3.

Як бачимо з наведеної схеми, в ланцюзі виробництва молока встановлено чотири КТК за системою НАССР. КТК № 1 – стосується сирого неохолодженого молока, КТК № 2 – сирого охолодженого молока, причому ця точка контролю подана в трьох варіантах, що відповідають різним режимам зберігання охолодженого молока. КТК № 3 – це точка, в якій здійснюється контроль сирого охолодженого молока під час транспортування, і остання точка – КТК № 4 – призначена для контролю за процесом пастеризації молока.

Отже, для ефективного впровадження менеджменту мікробіологічного ризику необхідно розробляти модель, до якої вносити такі проміжні виробничі показники, як РО та РС, що сприяють виробників на виконання поставленої кінцевої меті щодо безпечності їх продукції. Крім того, такі виробничі параметри, як РО та РС, необхідно враховувати під час проведені інспектування або проведення аудитів молочних ферм. Для ефективного розроблення цих показників необхідно використовувати комплекс методів, які ми запропонували: метод прогнозування кількості КМАФАнМ, мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* та бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*), а також метод підрахунку вищезазначених показників РО та РС з використанням формул.

Цей комплекс заходів сприятиме виробництву молока гарантованої безпечності щодо таких важливих мікробіологічних показників, як КМАФАнМ, кількість мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* та бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*).



Рисунок 5.3 – Схема контролю виробництва молока з використанням показників Р₀ та РС

На рисунку 5.3 узагальнено показники виробничих критеріїв, що контролюються за умови встановлення виробничої мети виробником $Р_0 = 100$ тис. КУО/см³ або менше в 1 см³ сирого молока, призначеного для дитячого харчування. Як бачимо з цієї схеми, управління безпекою виробництва сирого молока охоплює не лише виробничі процеси, й виробничі ресурси. Це пояснюється тим, що людський фактор відіграє основну роль в ефективному функціонуванні всієї системи контролю за небезпеками, і тому є дуже важливим у навчанні персоналу, задіяному у виробничих процесах. Перевагою зазначеного використання виробничих критеріїв, установлених при науковій оцінці ризику, є те, що контроль та усунення такого небезпечного

чинника, як бактерії *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*, здійснюється в одному з основних першоджерел у харчовому ланцюзі виробництва молокопродуктів, і особливо молокопродуктів для дітей. Такий контроль має профілактичний характер і дає можливість більш ефективно усувати ризик щодо несприятливої дії його на здоров'я споживачів. Вищезазначене свідчить про те, що застосування виробничих мікробіологічних критеріїв на підставі мікробіологічного ризику *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* дасть можливість вдосконалити ветеринарно-санітарний контроль виробництва сирого збірного молока з ферм. Заходи щодо управління такою небезпекою, як бактерії *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* у вищезазначених КТК, можуть бути такими:

- визначений показник у КТК $< PO$ – заходи не застосовуються;
- визначений показник у КТК $= PO$ – заходи не застосовуються;
- визначений показник у КТК $> PO$ – заходи застосовуються для зниження ризику.

Використання проміжних виробничих орієнтирів, що представлено виробничою метою PO та проміжних критеріїв PC , дають можливість взаємозв'язати фактичні засоби контролю з рівнем захисту споживачів молокопродуктів.

Таким чином, державна служба ветеринарної медицини при здійсненні ветеринарно-санітарного контролю перевіряє дотримання виробником як виробничих критеріїв, так і офіційно встановлених.

На сьогодні в Україні немає офіційних мікробіологічних критеріїв для таких мікроорганізмів, як мікроорганізми родини *Enterobacteriaceae* та бактерії *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* при виробництві молока. З урахуванням здійсненої нами науково обґрунтованої оцінки ризику щодо бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* в харчовому ланцюзі виробництва молока визначено, що ризик від цих бактерій прямопропорційно залежить від рівня контамінації сирого молока мікроорганізмами родини *Enterobacteriaceae*. У той самий час при застосуванні пастеризації для молока з умістом мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* в межах $(10,6 \pm 0,1)$ КУО/см³ при

термічному режимі 72 °С упродовж 30 секунд ризик щодо мікроорганізмів цієї родини і, зокрема, бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* характеризується як «низький». Але якщо початковий рівень контамінування сирого молока мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* знаходиться на рівні $(23,0 \pm 0,3)$ КУО/см³, або температура пастеризації нижча за 72 °С, то ризик щодо бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* підвищується і характеризується як високий.

У зв'язку з цим ми пропонуємо встановлення офіційно визнаних мікробіологічних критеріїв стосовно мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae*.

Концептуальні основи нового підходу щодо здійснення ветеринарного контролю теоретично та експериментально обґрунтовані і вони увійшли до проекту ДСТУ «Мікробіологічні критерії для харчових продуктів. Методи встановлення відповідності. Загальні вимоги», який на сьогодні офіційно схвалений Національною Комісією Кодекс Аліментаріус, Інститутом гігієни та медичної екології ім. О. М. Марзєєва Академії медичних наук України, Інститутом мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного, Інститутом екогігієни і токсикології ім. Л. І. Медведя та узгоджується за основним змістом із положеннями Регламенту ЄС 7025/2005 «Microbiological criteria for foodstuff» [372].

Новий підхід на підставі оцінки мікробіологічного ризику включає таке поняття, як «мікробіологічний критерій». Мікробіологічний критерій – це науково обґрунтований комплекс показників, які сприяють забезпеченню мікробіологічної безпечності харчових продуктів та ґрунтуються на наукових даних оцінки ризику і використовуються для забезпечення захисту здоров'я споживачів харчових продуктів. Мікробіологічні критерії поділяють на два види: мікробіологічні критерії для харчових продуктів та мікробіологічні критерії санітарії і гігієни виробничого процесу.

Мікробіологічний критерій харчового продукту – комплекс показників, за якими визначають придатність харчового продукту чи партії харчових

продуктів для споживання людиною; він виражається у відсутності або наявності певної кількості мікроорганізмів, і/або їх токсинів/метаболітів на одиницю маси, об'єму, площі або партії.

Мікробіологічний критерій гігієни виробничого процесу – це комплекс показників, що визначають конкретні допустимі значення контамінації санітарно-показовими мікроорганізмами певного об'єкта виробничого процесу, який свідчить про належне гігієнічне виробництво харчових продуктів на конкретному етапі виробництва.

Крім вищезазначеного, мікробіологічні критерії розробляються для виробничого процесу, які на міжнародному рівні позначаються як РО та РС і є неофіційними. Неофіційні мікробіологічні критерії розробляються на основі наукових досліджень для конкретних виробництв відповідно до їх мети щодо безпечності харчового продукту. Так, якщо метою виробника є виробництво молока гатунку «екстра», то виробничі критерії будуть мати одне значення, а за мети виробника виробляти молоко другого гатунку – значення мікробіологічних критеріїв будуть іншими.

Офіційні мікробіологічні критерії також розробляються для конкретних мікроорганізмів окремо науковцями та офіційно схвалюються, тому вони є обов'язковими для виконання та контролювання.

Мікробіологічні критерії використовують для:

- формування необхідних вимог у відповідних технічних регламентах, стандартах, санітарних нормах і правилах щодо виробництва та обігу харчових продуктів і сировини;
- визначення оптимальних мікробіологічних показників (критичних меж) у критичних точках контролю сировини, компонентів та готових продуктів на будь-якому етапі продовольчого ланцюга для забезпечення безпечності харчових продуктів;
- одержання інформації про мікробіологічний ризик.

Мікробіологічний критерій повинен визначати:

- харчовий продукт, до якого критерій відносять;

- точку(и) контролю в продовольчому ланцюзі, де критерій застосовується;

- заходи, які необхідно виконати у випадку недотримання мікробіологічного критерію.

Підтвердження відповідності до мікробіологічних критеріїв здійснюється шляхом відбору проб та визначення в них кількісних характеристик мікроорганізмів. Для кожного мікробіологічного критерію визначається індивідуальний підхід щодо процедури відбору проб. Проби відбирають у певній кількості від партії продукції, а під час досліджень цих проб установлюють співвідношення кількості проб, в яких досліджувані мікроорганізми виявлені в дозволених кількостях до кількості проб, в яких вміст досліджуваних мікроорганізмів вищий від офіційно визначеного рівня. Для того щоб офіційно встановлювати відповідність продукції, що виробляється, до мікробіологічних критеріїв, необхідно розробляти план відбору проб. Ці плани відбору проб бувають двох видів. Принцип поділу планів відбору на види визначають підходом, який будуть застосовуватись для оцінки відповідності до мікробіологічних критеріїв. Нижче наведено визначення до цих двох видів планів відбору проб.

План відбору проб на відповідність до мікробіологічних критеріїв 2 рівнів оцінювання – план відбору проб, під час розроблення та використанні якого передбачають два види (рівні) оцінювання відповідності до мікробіологічних критеріїв певного харчового продукту (партії) чи об'єкта технологічного процесу:

- «прийнятний рівень відповідності до мікробіологічного критерію ...»;
- «неприйнятний рівень відповідності до мікробіологічного критерію...».

План відбору проб на відповідність до мікробіологічних критеріїв 3 рівнів оцінювання – план відбору проб, під час розроблення та використання якого передбачають три рівні (види) оцінювання відповідності до мікробіологічних критеріїв певного харчового продукту (партії) чи об'єкта технологічного процесу:

- «прийнятний» рівень відповідності ...»;
- «гранично прийнятний» рівень відповідності ...»;
- «неприйнятний» рівень відповідності ...».

З урахуванням вищезазначеного для позначення офіційних показників, що використовуються для встановлення відповідності до мікробіологічних критеріїв, використовують такі символи: «m», «M», «n» і «c»:

- зазначення «n» – кількість точкових проб, що складають загальну (об'єднану) пробу і відібрані від певної партії харчового продукту та/чи продовольчої сировини, чи об'єктів технологічного процесу шляхом випадкової вибірки відповідно до вимог конкретного плану відбору проб;

- зазначення «c» – максимально допустима кількість точкових проб з неприйнятним рівнем відповідності до мікробіологічного критерію відповідно до плану 2 рівнів оцінювання та кількість точкових проб, в яких виявлено гранично прийнятний рівень відповідності (досліджувані мікроорганізми кількістю, що знаходиться в діапазоні $> m$, але $< M$ (вище від m або менше ніж M) згідно з планом 3 рівнів оцінювання. У разі перевищення значення «c» у загальній пробі, партія вважається неприйнятною для споживання;

- зазначення «m» – мінімально допустиме значення мікробіологічного показника, встановлене на національному рівні;

- зазначення «M» – максимально допустиме значення мікробіологічного показника, встановлене на національному рівні. Перевищення верхньої межі мікробіологічного критерію «M» вважається небезпечним для здоров'я людини.

Мікробіологічний критерій складається з таких складників:

- точне найменування харчового продукту, до якого застосовують критерій;

- найменування мікроорганізмів та/або їх токсинів/метаболітів, які можуть завдати шкоди організму людини та які регламентуються даним мікробіологічним критерієм;

– найменування аналітичного методу, який необхідно застосовувати для виявлення чи визначення кількості згаданих мікроорганізмів;

– плану відбору проб із зазначенням кількості та величини проб, які необхідно відбирати з партії продукції чи контрольної точки технологічного процесу для забезпечення необхідної репрезентативності результату, мікробіологічних показників безпечності, встановлений для конкретного продукту, продовольчої сировини чи технологічного процесу, враховуючи величини n , c , m , M .

Мікробіологічний критерій може бути у формі:

– мікробіологічного стандарту, тобто критерію, який затвердженого повноважними державними органами у вигляді національного нормативного документа;

– мікробіологічної специфікації, тобто критерію, який застосовується виробники харчових продуктів та кормів для визначення якості та безпеки сировини, компонентів та готової продукції;

– мікробіологічної настанови (інструкції).

Підтвердження відповідності до мікробіологічного критерію дає можливість забезпечити гарантування в такому:

– що доставлення, оброблення та перероблення сировини і виробництво харчового продукту були під контролем і виконувалися з додержанням санітарних та гігієнічних норм технологічного процесу;

– що нормативні значення показників мікробіологічної безпечності харчового продукту додержуватимуться впродовж усього терміну його придатності за умови додержання чинних гігієнічних параметрів його реалізації, зберігання і використання.

Мікробіологічні критерії за необхідності переглядають та змінюють або доповнюють для врахування нових наукових даних у галузі мікробіологічної безпечності харчових продуктів, а також за результатами оцінки мікробіологічного ризику.

Учасники господарської діяльності у сфері виробництва та обігу харчових продуктів (виробники) повинні встановлювати відповідність мікробіологічних критеріїв для:

- самоперевірки щодо належної гігієнічної практики та підтвердження ефективності функціонування HACCP системи чи аналогічної системи забезпечення безпечності;

- підтвердження дотримання національних мікробіологічних критеріїв, установлених у санітарних заходах та ветеринарних вимогах до кожного виду харчового продукту на всьому харчовому ланцюзі.

Виробники також повинні для встановлення виробничих мікробіологічних критеріїв застосовувати методи в межах системи керування безпечністю харчових продуктів (HACCP) чи аналогічної системи забезпечення безпечності та вносити до неї посилення на впровадження належної гігієнічної практики (GHP) і належної виробничої практики (GMP), а також підтверджувати відповідність до мікробіологічних критеріїв уповноважених офіційних осіб, яким доручено здійснювати державний контроль за безпечністю харчових продуктів та встановлювати відповідність до мікробіологічних критеріїв шляхом:

- застосування методології відбору проб, установлених у плані відбору проб;

- проведенням досліджень відібраних проб в офіційно визначених лабораторіях та у виробничих лабораторіях (для самоконтролю);

- застосування коригувальних дій у випадку встановлення невідповідності мікробіологічним критеріям.

Для встановлення відповідності до мікробіологічних критеріїв виробники повинні внести методи досліджень до складу системи керування безпечністю харчових продуктів (HACCP), яка повинна бути впроваджена на його підприємстві.

Також виробники для підтвердження відповідності до мікробіологічних критеріїв харчових продуктів забезпечують здійснення відбору проб та їх

дослідження як самоконтроль на кожній стадії виробництва, перероблення й обігу харчових продуктів відповідно до процедур, що входять до запровадженої на виробництві системи НАССР та правил належної гігієнічної практики.

У Проекті ДСТУ визначено обов'язки уповноважених офіційних осіб щодо встановлення відповідності до мікробіологічних критеріїв.

1. Уповноважені офіційні особи, яким доручено здійснювати держаний контроль за безпечністю харчових продуктів, визначають відповідність до мікробіологічних критеріїв у складі процедури перевірки виробництва харчових продуктів щодо дотримання вимог санітарних заходів та ветеринарних вимог.

2. Уповноважені офіційні особи, яким доручено здійснювати держаний контроль за безпечністю харчових продуктів при встановленні відповідності до мікробіологічних критеріїв визначають недоліки в управлінні в критичних точках керування (КТК).

3. Уповноважені офіційні особи, яким доручено здійснювати держаний контроль за безпечністю харчових продуктів визначають відповідність до мікробіологічних критеріїв під час здійснення:

- а) державного моніторингу харчового ланцюга;
- б) перевірки планової;
- а) перевірки вимушеної.

Отже, використання мікробіологічних критеріїв становить невід'ємну частину виконання процедур на підставі принципів системи НАССР чи аналогічної системи забезпечення безпечності та інших заходів контролю санітарно-гігієнічного стану на підприємстві з виробництва харчових продуктів.

Установлення відповідності до мікробіологічних критеріїв здійснюють:

- а) виробники у сфері виробництва та/або обігу харчових продуктів у межах запровадженої на їх підприємствах системи НАССР;
- б) відповідальні особи органів виконавчої влади.

На підставі наших досліджень щодо оцінки ризику *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) було встановлено, що в харчовому ланцюзі виробництва молока вищих гатунків, призначеному для використання у технології дитячого харчування, доцільно встановити офіційно визначені мікробіологічні критерії в такій ланці як «пастеризація», що позначається як КТК №4. Для цієї точки керування безпечністю молока необхідно ввести такі мікробіологічні критерії, які узгоджуються з мікробіологічними критеріями в Регламенті ЄС 2073:2005 та наведені в таблиці 3.36.

При перевищенні мікробіологічного критерію гігієни виробничого процесу пастеризації молока необхідно застосовувати коригувальні заходи, щоб підтримати рівень гігієни відповідно до національного харчового та ветеринарно-санітарного законодавства.

У разі недотримання мікробіологічних критеріїв гігієни виробничого процесу необхідно здійснювати заходи щодо обстеження гігієни технологічних процесів та перегляду гігієнічних процедур на підприємстві.

- покращання гігієни виробництва харчових продуктів;
- покращання відбору походження сировини;
- навчання персоналу;
- збільшення періодичності відбору проб.

Таблиця 5.5 – Мікробіологічні критерії для пастеризованого молока, щодо мікроорганізмів родини

Enterobacteriaceae

Вид харчового продукту	Мікроорганізм	План відбору проб		Межове значення		Аналітичний еталонний метод	Стадія, де визначається мікробіологічний критерій	Захід у випадку незадовільних результатів
		n	c	m	M			
Пастеризоване молоко	<i>Enterobacteriaceae</i>	5	0	10 КУО/см ³	ISO 21528-2	У кінці виробничого процесу	Контроль ефективності пастеризації молока та попередження повторної його контамінації	Пастеризоване молоко

Особи, які здійснюють виробництво та/або обіг харчових продуктів, зобов'язані аналізувати динаміку результатів досліджень. У разі коли спостерігається тенденція до незадовільних результатів, вони повинні терміново застосовувати відповідні заходи, щоб виправити ситуацію та попередити виникнення мікробіологічних ризиків. Для виробництва високоякісного молока на молочних фермах необхідно розробляти та впроваджувати належну виробничу практику – GMP та належну гігієнічну практику – GHP. Належна гігієнічна практика розробляється для кожної молочної ферми окремо з урахуванням можливостей фермера в забезпеченні рівня санітарно-гігієнічних заходів та на підставі його цілей щодо санітарних показників сирого молока при здаванні на молокопереробне підприємство.

При встановленні невідповідності до зазначених мікробіологічних критеріїв пастеризованого молока, призначеного з метою подальшого використання для продуктів дитячого харчування, можна приймати рішення щодо необхідності піддавати його повторному тепловому обробленню, щоб забезпечувати безпечність для споживачів, або офіційні коригувальні дії можуть стосуватися перероблення на молокопродукти не для дитячого харчування.

Ми також запропонували мікробіологічні критерії для процесу приймання сирого збірного молока на молокопереробному підприємстві, які були теоретично та експериментально обґрунтовані. В наслідок цього сформовані нові концептуальні принципи для контролю бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) в сирому збірному молоці корів під час приймання на молокопереробні підприємства. Ці принципи базуються на встановленні співвідношення між кількістю мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* та кількістю *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*). У разі якщо кількість мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* становить $(3,5 \pm 0,1)$ КУО/см³ (для молока гатунку «екстра») або $(10,6 \pm 0,1)$ КУО/см³ (для молока вищого гатунку) проводять постійний періодичний контроль за наявністю мікроорганізмів лише родини *Enterobacteriaceae*. Якщо їх кількість більша за

зазначену, то проводять, крім досліджень на наявність мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae*, визначення бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*). Оскільки ми встановили закономірність у співвідношенні між наявністю мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* та кількістю бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*).

Таким чином, у цьому розділі монографії ми на підставі теоретичного та експериментального обґрунтування сформуваємо комплекс управлінських заходів щодо попередження потрапляння бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) в молокопродукти із сирого молока корів. Цей комплекс заходів був сформований відповідно до сучасного міжнародного підходу – ОМР у харчовому ланцюзі виробництва молока. Для ефективного управління ОМР стосовно бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) розроблено та запропоновано виробничі мікробіологічні критерії (РО) для встановлення їх у КТК під час виробництва молока ґатунку «екстра».

Таким чином, у кожній КТК, яких у харчовому ланцюзі виробництва молока чотири, встановлюється по три мікробіологічні критерії: РО₃ КМАФАнМ, РО₃ *Enterobacteriaceae* та РО₃ *E. sakazakii*. Для управління цими показниками для виробничих процесів розроблено виробничі заходи у вигляді РС. Ці заходи є параметрами для температури та часу охолодження і до параметрів пастеризації.

Отже, виробники можуть ефективно дотримуватися основних мікробіологічних показників, щоб попереджувати харчові отруєння від бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*). Крім виробничих критеріїв, повинні бути й офіційні мікробіологічні критерії, яких необхідно дотримуватися виробникам обов'язково, щоб їх продукція була гарантованої безпечності. Офіційний мікробіологічний критерій – це показник, який розроблено конкретно на певний вид чи групу мікроорганізмів. Так, ми розробили мікробіологічні критерії на такі групи мікроорганізмів, як МАФАнМ, та мікроорганізми родини *Enterobacteriaceae*. Мікроорганізми родини *Enterobacteriaceae* – це нова для України група мікроорганізмів для використання у вигляді індикаторів.

Для мікробіологічного критерію ми залучили необхідний комплекс показників: значення кількості мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae*, порядок відбору проб і порядок оцінювання досліджуваних проб. Згідно з установленим офіційним мікробіологічним критерієм у молоці після пастеризації повинно бути мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* не більше ніж 10 КУО/см³, причому таке значення повинно бути встановлене в 5 пробах, що одночасно відібрані з партії молока.

Відстежування бактерій *Cronobacter spp. (Enterobacter sakazakii)* у харчовому ланцюзі від «лану до столу». У харчовому ланцюзі відстеження означає здатність здійснювати нагляд за харчовими продуктами чи сировиною або інгредієнтами, з яких виробляються продукти харчування на всіх етапах виробництва. ЄС випустив нові керівництва для полегшення відстеження харчових продуктів на територіях усіх держав-членів [97, 98, 379]. Ці вимоги передбачають відстеження харчових продуктів, вилучення небезпечної продукції з ринку, обов'язки виробника і вимоги щодо експорту й імпорту.

Відстеження – це частина ефективної системи, що забезпечує надання інформації про всі етапи виробництва та поширення для будь-яких харчових продуктів. Первинна роль відстеження – захист споживачів та полегшення швидкого вилучення небезпечної продукції з продажу. В системі відстеження залучені урядові органи, виробництво та споживачі. Ймовірність появи інциденту та його наслідки від певного ризику може бути оцінено з використанням матриці ризику.

Ураховуючи процеси вступу України до СОТ та перспективи вступу до ЄС, приділяється багато уваги реформуванню системи державного регулювання безпечності харчових продуктів і продовольчої сировини. Без створення регуляторної системи українська харчова продукція не буде спроможна конкурувати на міжнародних ринках [9, 10, 13, 16, 17].

Сучасне міжнародне харчове законодавство базується на стандартах та рекомендаціях Комісії Кодекс Аліметаріус (ККА), які є основою для розроблення Європейських директив. У європейському харчовому

законодавстві визначено високий рівень захисту споживачів, тварин та довкілля, і воно базується на наукових дослідженнях та сприяє міжнародній торгівлі.

На сьогодні в нашій країні на офіційному рівні найбільш вивчено і триває процес гармонізації до основоположних директив ЄС, що формують основу європейського харчового законодавства. Схематично ці директивні документи представлені нижче.

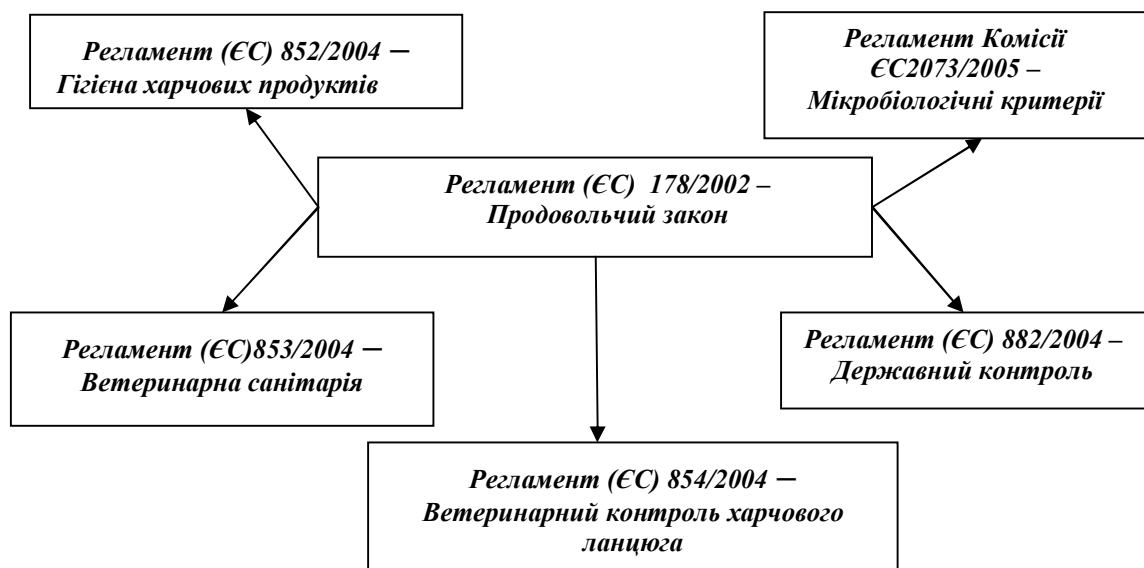


Рисунок 5.4 – Основоположні регламенти харчового законодавства ЄС

Як бачимо із вищенаведеної схеми, до складу основних європейських регламентів входить Регламент Комісії ЄС 2073/2005 «Мікробіологічні критерії для харчових продуктів». Важливість цього Регламенту визначається тим, що в ньому встановлено методологію визначення та контролювання мікробіологічних ризиків у харчових продуктах та гігієни їх виробництва. Необхідно зазначити, що методологічні підходи, встановлені в цьому регламенті стосовно контролю мікробіологічних небезпек у харчових продуктах, істотно відрізняються від існуючих методів в Україні. Але для гарантування безпечності харчових продуктів за мікробіологічними

показниками та для успішної торгівлі ними як на внутрішньому, так і на міжнародному ринках необхідно знати та використовувати цю методологію.

Безпека молочних продуктів і зокрема сухих молочних продуктів для дитячого харчування залежить від якості сировини, правильної її оброблення, попередження післяпастеризаційної контамінації сировини чи продукту, а також контролю параметрів зберігання та приготування продукту [15, 66, 67, 96–98].

Визначання мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* використовуються як індикатор для встановлення мікробіологічної безпечності сировини та харчових продуктів, оскільки їх наявність свідчить про рівень дотримання санітарно-гігієнічних вимог при виробничих процесах. Мікроорганізми родини *Enterobacteriaceae* є мешканцями шлунково-кишкового тракту людей та тварин, які з їх виділеннями потрапляють у довкілля, забруднюючи його. У нашій країні мікроорганізми родини *Enterobacteriaceae* не використовують як індикаторні мікроорганізми, але така вимога існує в країнах ЄС, США, Канаді та інших країнах. Основними індикаторними мікроорганізмами в Україні вважаються *E. coli* [15, 66, 67, 96 – 98, 314].

Визначення мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* в сирому молоці є особливо актуальним для молока-сировини, що використовується для виробництва харчових продуктів для дітей. Показником мікробіологічної безпечності сирого молока в країнах ЄС є дотримання виробником відповідності до мікробіологічних критеріїв щодо *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) та кількості мезофільних аеробних і факультативно-анаеробних мікроорганізмів (КМАФАнМ). У цьому переліку показників мікробіологічної безпечності істотне значення для визначення придатності молока для виробництва молокопродуктів є встановлення співвідношення кількості *Enterobacter sakazakii* до загальної кількості мікроорганізмів.

Ураховуючи те, що Україна має намір експортувати молокопродукти в країни ЄС, актуальним є виконання вимог цих країн до якості та безпечності цих харчових продуктів. Першочерговою умовою для виробництва якісних та безпечних молочних продуктів є якісна та безпечна сировина. Молочна сировина вважається якісною та безпечною лише тоді, коли є гарантія попередження всіх можливих небезпек, і особливо патогенних мікроорганізмів. Оскільки в національних нормативних документах не передбачено контролювання сирого молока на вміст мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae*, і зокрема роду *Enterobacter*, вважаємо актуальним проведення наукових досліджень щодо встановлення ступеня поширення цих мікроорганізмів в сирому молоці та об'єктах, що контактують із ним при його виробництві.

Ми проаналізували всі етапи харчового ланцюга «від лану до столу» стосовно бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* [15, 66, 67, 96–98].

Важливість контролю *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* для молокопереробної індустрії полягає в такому:

- збудник потрапляє в сире збірне молоко від хворих на мастит корів та з молочного обладнання, на якому утворює біоплівки;
- гине при пастеризації;
- післяпастеризаційна контамінація молока збудником із технологічного обладнання та при внесенні інгредієнтів на молокопереробному підприємстві;
- збудник не росте в сухих субстратах, проте довготривалий час зберігає свою життєдіяльність у них;
- відновлені сухі молочні продукти, що містять збудник, є потенційним джерелом ризику за умови зберігання впродовж тривалого часу за підвищених температури;

• забруднення збудником і його ріст у молочних продуктах може статися при незадовільній гігієні приготування та споживання в домашніх умовах.

Молочна ферма. Сире молоко містить асоціації різних видів мікроорганізмів, зокрема й умовно-патогенних та патогенних, які потрапляють у нього різними шляхами. Перший шлях – від тварин: безпосередньо із вим'я (при маститах), зовнішніх покривів вим'я та шкіри. Другий шлях – із зовнішнього середовища: молочне обладнання, вода повітря та від обслуговуючого персоналу.

Знання шляхів потрапляння мікроорганізмів у сире молоко під час його отримання на молочній фермі може застосовуватися для контролю з метою зниження ризику потрапляння мікроорганізмів, що істотно впливає на кінцевий мікробіологічний статус сирого молока.

Стан *здоров'я тварин* має істотний вплив на мікробіологічні показники та якість сирого молока. Основним захворюванням дійних корів є запалення молочної залози або мастит. Секрет вим'я від корів хворих на мастит містить велику кількість різноманітних мікроорганізмів та соматичних клітин, які можуть потрапляти в сире збірне молоко.

Найбільш часто серед мікроорганізмів маститного молока виділяють стрептококи (*Streptococcus agalactiae*), стафілококи (*Staphylococcus aureus*), коринебактерії (*Corynebacterium bovis*) та ентеробактерії [15, 80–85, 87–91, 211]. У таблиці 5.6 наведено основні групи мікроорганізмів, які були виділені з сирого збірного молока.

Таблиця 5.6 – Основні групи мікроорганізмів у сирому збірному молоці

Група мікроорганізмів	Відсоток
1	2
<i>Micrococcus, Staphylococcus</i>	30–99
<i>Streptococcus, Enterococcus</i>	0–50
Грам-позитивні палички: <i>Asporogenous, Corynebacterium, Microbacterium</i>	< 10

Продовження таблиці 5.6

1	2
Грам-негативні палички: <i>Klebsiella</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Pseudomonas</i>	< 10
Спороутворювальні мікроорганізми, зокрема <i>Bacillus spp.</i>	< 10
Дріжджі, плісняві гриби	< 10

Ми провели власні дослідження стосовно вивчення рівня контамінації сирого збірного молока корів, секрету молочної залози від корів, хворих на субклінічний та клінічний мастит, а також об'єктів молочної ферми мікроорганізмами родини *Enterobacteriaceae*, і при цьому встановити кількісне співвідношення між мезофільними аеробними та факультативно-анаеробними мікроорганізмами (КМАФАнМ) й окремими мікроорганізмами родини *Enterobacteriaceae* [15, 83–85, 87–91, 211].

Об'єкти досліджень: секрет молочної залози від здорових корів (сире молоко) і хворих на мастит (субклінічний та клінічний), змиви з шкіри дійок вим'я та шкірних покривів тіла корови, змиви з доїльних апаратів, молочних бідонів та молочного танка, змиви зі стін корівника та повітря корівника.

Проби сирого молока, секрету молочної залози від хворих на мастит (субклінічний та клінічний) корів та змиви для мікробіологічних досліджень були відібрані з молочнотоварних ферм Сумської області. Усього було досліджено 112 проб.

Для індикації та ідентифікації мікроорганізмів родин *Enterobacteriaceae* та *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) використовували методи, викладені у вітчизняних методичних рекомендаціях, які ми розробили та гармонізували відповідно до сучасних міжнародних стандартів [97, 98].

Мікроорганізми родини *Enterobacteriaceae* визначали шляхом посіву на глюкозо-жовчний агар із кристалічним фіолетовим та нейтральним червоним. Після інкубації посівів за температури $(37 \pm 2) ^\circ\text{C}$ упродовж 36 годин підраховували кількість колоній, що вирости та визначили кількість колонієутворювальних одиниць в одиниці об'єму досліджуваного матеріалу

(КУО/см³). Для встановлення роду мікроорганізмів із родини *Enterobacteriaceae* проводили подальші мікроскопічні та біохімічні дослідження [116, 159].

Сире збірне молоко корів залежно від рівня санітарної культури при його отриманні, а також від стану здоров'я вимені корів може містити від 3 тис. до кількох мільйонів КУО/см³ мікроорганізмів. Серед цих мікроорганізмів імовірно можуть бути і патогенні. Імовірність контамінації молока патогенними мікроорганізмами збільшується прямо пропорційно до величини КУО/см³.

Ми провели мікробіологічні дослідження проб сирого молока корів на наявність у ньому груп патогенних мікроорганізмів залежно від кількості КУО/см³. Результати наведені в таблиці 5.7.

Таблиця 5.7 – Кількісна характеристика контамінації сирого молока корів патогенними мікроорганізмами залежно від кількості загальної мікрофлори в ньому (n = 104).

Група мікроорганізмів	Результат досліджень проб молока із вмістом мікроорганізмів до 500 тис./см ³ (n = 52)		Результат досліджень проб молока із вмістом мікроорганізмів від 800 тис./см ³ до 1 млн/см ³ (n = 52).	
	к-ть проб	відсоток	к-ть проб	відсоток
Стафілококи	22	42,3	41	78,8
Стрептококи	13	25	23	44,2
Ешерихії	9	17,3	17	32,7
Ентеробактерії	20	38,5	43	82,7
Псевдомони	19	36,5	30	57,8
Бацилюс	18	34,6	33	63,5
Сальмонели	3	5,8	13	25

Як бачимо з таблиці 5.7, найчастіше в сирому молоці виділялися такі групи мікроорганізмів, як стафілококи, ентеробактерії, псевдомони. Причому в

молоці, в якому загальна кількість бактерій була вищою, ці мікроорганізми виділялися в середньому в 1,5–2 рази частіше.

Ми звернули особливу увагу на те, що в сирому молоці досить часто виділялися мікроорганізми родини *Enterobacteriaceae*. Характерним було те, що в усіх пробах виділялись різні асоціації кількох видів мікроорганізмів одночасно.

Ми дослідили секрет вимені корів, хворих на мастит, для ідентифікації мікроорганізмів у ньому. Результати дослідження наведені в діаграмі на рисунку 5.5.

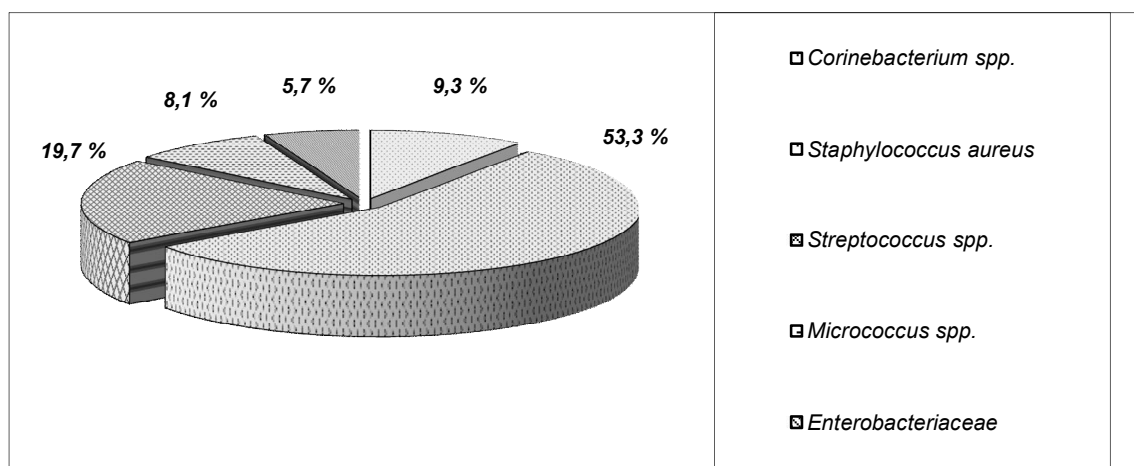


Рисунок 5.5 – Мікроорганізми, ідентифіковані із секрету вимені корів, хворих на мастит (n = 32)

Як бачимо з наведеної діаграми, найбільш часто із секрету вим'я корів, хворих на мастит, виділялися *Staphylococcus aureus* – у 53,3 % випадків, на другому місці за частотою виділення були стрептококи – 19,7 %, бактерії роду *Enterobacteriaceae* були виділені в 9,3 % випадків. Отже, секрет вим'я корів хворих на субклінічний мастит є одним із джерел контамінації сирого молока патогенними мікроорганізмами, і зокрема мікроорганізмами родини *Enterobacteriaceae*.

Отже, згідно з нашими дослідженнями та даними зарубіжних і вітчизняних джерел здоров'я дійних корів істотно впливає на загальну кількість мікроорганізмів у сирому молоці, а також на видовий і кількісний склад

мікрофлори родини *Enterobacteriaceae* у ньому. Одержані результати досліджень свідчать також про те, що такі патогенні мікроорганізми, як *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*, можуть виділятися із сирого молока та із секрету вим'я корів, хворих на мастит.

Фекальна контамінація. Фекалії дійних корів можуть містити велику кількість мікроорганізмів, які можуть потрапляти в сире молоко. Фекальне забруднення шкіри тіла тварин та шкіри вим'я є **неминучим**, оскільки фекалії тварин досить поширені на об'єктах молочної ферми та потенційно сприяють циклічності мікроорганізмів через забруднення води, корму та ґрунту. Крім того, фекальний матеріал може безпосередньо контамінувати сире молоко під час доїння через погано вимиту шкіру вим'я дійних корів, волосяний покрив або шерсть тварин, що випадково потрапили.

Гігієнічний стан молочного обладнання також повинен впливає на мікробний стан сирого молока. Важливим є дотримання належної гігієни та санітарії доїльного та молочного обладнання. Залишки молока, які залишилися на молочному обладнанні після незадовільного миття та дезінфекції, є хорошим поживним середовищем для мікроорганізмів, що сприяє їх росту та розмноженню, і під час подальшого використання молочного обладнання ці мікроорганізми потрапляють у нову партію молока. Вид та кількість мікроорганізмів, що залишаються на молочному обладнанні, більшою мірою залежить від ефективності миття та дезінфекції і меншою – від біологічних характеристик самих мікроорганізмів.

Основні принципи належного миття та дезінфекції молочного обладнання передбачають хімічні (ефективні мийно-дезінфекційні речовини), термічні (відповідна кількість гарячої води) та фізичні (достатній час контакту) процеси.

Контамінація сирого збірного молока також може відбуватися під час фільтрування, охолодження і проміжного зберігання на молочній фермі.

Обслуговуючий персонал безпосередньо контактує з дійним стадом та доїльним обладнанням і є потенційним джерелом забруднення сирого збірного

молока на фермі під час його отримання. Мікроорганізми в сире молоко від обслуговуючого персоналу в основному потрапляють із верхніх дихальних шляхів та через шкіру рук, особливо при ручному доїнні.

Виявлення бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) у фекаліях людини та на поверхні шкіри свідчать про наявність цих мікроорганізмів в організмі людини, ствоюючи їх потенційним джерелом забруднення під час виробництва та приготування харчових продуктів.

Отже, згідно з нашими дослідженнями та даних зарубіжних та вітчизняних джерел здоров'я дійних корів та санітарно-гігієнічний стан об'єктів молочної ферми істотно впливає на загальну кількість мікроорганізмів у сирому молоці і на видовий та кількісний склад мікрофлори родини *Enterobacteriaceae* в ньому. Одержані результати досліджень свідчать також про те, що такі патогенні мікроорганізми, як *Escherichia spp.* та *Enterobacter spp.* досить часто і значною кількістю виділяються із сирого молока, секрету вим'я корів, хворих на мастит, та з об'єктів молочної ферми, що контактують з молоком.

Отже, в результаті проведеної роботи зробили такі висновки:

1. У сирому збірному молоці корів виділяли такі групи мікроорганізмів як стафілококи, ентеробактерії, псевдомони. Причому в молоці, в якому загальна кількість бактерій була від 800 тис. до 1 млн КУО/см³ ці мікроорганізми виділялися в 1,5–2 рази частіше порівняно з молоком, у якому було до 500 тис. КУО/см³.

2. Серед виділених груп мікроорганізмів сирого збірного молока найбільш часто виділялися стафілококи – від 42,3 до 78,8 %, а на другому місці за частотою виділення були ентеробактерії від 38,5 до 82,7 %.

3. Установлено, що в секреті вимені корів, хворих на мастит, виділялися такі мікроорганізми: *Staphylococcus aureus* – у 53,3 % випадків, стрептококи – 19,7 %, бактерії роду *Enterobacteriaceae* – 9,3 % випадків.

4. Істотним джерелом контамінації сирого молока бактеріями родини *Enterobacteriaceae* є секрет вимені корів, хворих на мастит.

5. Із досліджуваних 104 проб сирого збірного молока в 4 пробах були виділені такі мікроорганізми, як *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*, ідентифіковані за показниками визначника Берджі.

6. Установлено, що мікроорганізми з родини *Enterobacteriaceae* виділяються з усіх досліджуваних проб, проте їх кількість і вміст у загальній кількості мікроорганізмів відрізнявся.

7. Найчастіше з усіх досліджуваних проб були виділені мікроорганізми родів *Escherichia* та *Enterobacter*, рідше – *Salmonella* і *Proteus*.

8. Найбільша кількість мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* була встановлена у пробах секрету молочної залози корів, хворих на субклінічний мастит, змивах із шкірних покривів тварин, з підлоги та повітря молочної ферми.

Ураховуючи актуальність визначення мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae*, і зокрема таких патогенних мікроорганізмів, як *Enterobacter spp.*, у сирому молоці для отримання безпечних молокопродуктів одержані результати мають велике значення для наукового обґрунтування мікробіологічного ризику й сприятимуть наближенню національних вимог щодо безпечності харчових продуктів до вимог ЕС.

Зберігання і транспортування сирого молока. Отримане на молочної фермі молоко повинне належним чином зберігатися й транспортуватися для попередження розвитку і контамінації мікроорганізмів. Молоко на фермі зберігається за температури 4–6 °С. За такої самої температури воно повинно транспортуватися й зберігатися на приймальному пункті при молочнопереробному підприємстві.

Пастеризація молока. Після доїння сире збірне молоко передається на молокопереробні підприємства та підлягає первинному термічному обробленню. Найчастіше використовують пастеризацію, основною метою якої є зниження мікробного фону сирого збірного молока. Проте її ефективність залежить від первинної кількості мікроорганізмів у сирому збірному молоці. Отже, контроль або управління мікробіологічними ризиками на етапі

пастеризації сирого збірного молока сприятиме їх мінімізації та попередженню поширенню. Найчастіше застосовують високотемпературну пастеризацію (72 °C – 15 секунд) або ультрависокотемпературну.

Дані стосовно виживання *Enterobacter sakazakii* після пастеризації досить суперечливі. Одні автори стверджують, що загальноприйняті режими пастеризації згубно діють на збудника. Однак є відомості, що бактерії *E. sakazakii* виділяли з пастеризованого молока методом ультрависокого температурного оброблення (72 °C – 15секунд), і це пов'язують із післяпастеризаційною контамінацією. Крім того, мікроорганізм вважається досить терmostійким з усіх ентеробактерій.

Післяпастеризаційна контамінація молока є одним із важливих моментів під час виробництва безпечних молочних продуктів, зокрема для дитячого харчування. Повторне потрапляння мікроорганізмів у пастеризоване молоко може відбутися з молочного обладнання, від працівників молокопереробного підприємства або під час додавання необхідних інгредієнтів, що містять певну кількість мікроорганізмів. Тому строгий контроль за дотриманням виробничої та особистої гігієни працівниками молокопереробного підприємства і належного оброблення інгредієнтів на цьому етапі є важливим у плані забезпечення безпечності кінцевого продукту.

Отже, пастеризація сирого молока є важливим технологічним етапом під час виробництва сумішей для дитячого харчування, оскільки бактерії *Cronobacter spp.* можуть виживати при розпилювальному сушінні пастеризованого молока.

Технологічний процес. Бактерії *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) є важливим мікробіологічним ризиком під час виробництва сухих молочних продуктів (сухе молоко, сухе знежирене молоко, суха пахта і сироватка, сухі інгредієнти для молозива), зокрема сухих молочних сумішей для дитячого харчування.

Тому коротко наводимо основні технологічні етапи виробництва сухих молочних продуктів та сухих молочних сумішей для дитячого харчування (рис. 5.6).

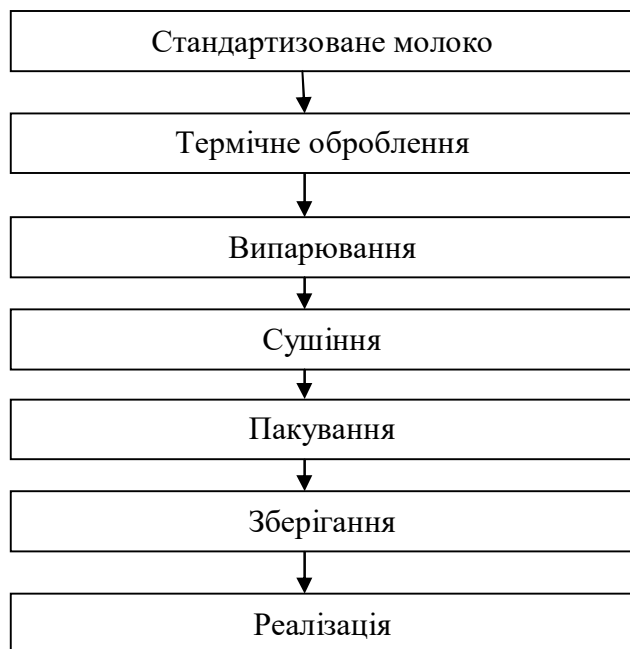


Рисунок 5.6 – Основні технологічні етапи виробництва сухих молочних продуктів

Під час виробництва сухих молочних продуктів відповідно підготовлене молоко (після випарювання) подають на сушіння для утворення сухого порошку. Мікробіологічні ризики в сухих молочних продуктах пов'язані з такими мікроорганізмами, як сальмонела, *L. monocytogenes*, *B. cereus*, *Cl. perfringens*, *S. aureus*, і особливо *Enterobacter sakazakii*. Ці мікроорганізми не ростуть у сухих молочних продуктах, проте зберігають свою життєдіяльність упродовж тривалого терміну і при відновленні та зберіганні відновлених сухих молочних продуктів сприяють ризику для споживачів.

Сухі молочні суміші для дитячого харчування є спеціальною категорією для сухих молочних продуктів і виробляються за подібною схемою порівняно з іншими сухими продуктами, але все ж таки має певні відмінності – додавання інгредієнтів (соєві білки, гідролізати білкові, жирові та вуглеводні компоненти, вітаміни, мінерали) (за даними ФАО).

Існує два основних способи виробництва сухих сумішей для дитячого харчування (сухе або вологе перемішування інгредієнтів або складових сухої молочної суміші), які схематично зображені на рис. 5.7.

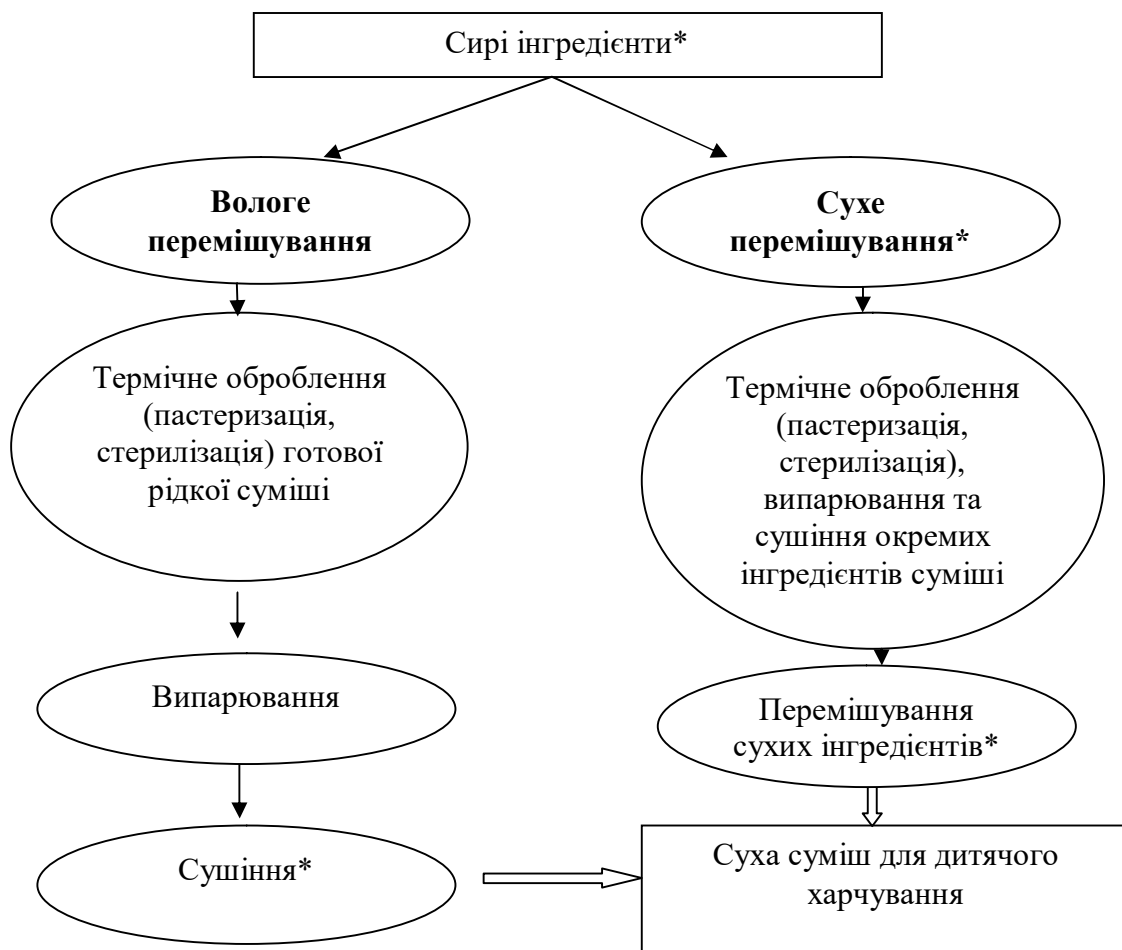


Рисунок 5.7 – Основні технологічні етапи виробництва сухих молочних сумішей для дитячого харчування вологим та сухим перемішуванням (зірочкою «*» позначені етапи мікробної контамінації)

Отже, під час виробництва сухих молочних сумішей шляхом *вологого перемішування* всі інгредієнти в рідкому стані проходять термічне оброблення, випарювання і потім сушіння. На відміну від цього при *сухому перемішуванні* інгредієнти окремо проходять термічне оброблення, їх випарюють, та сушаться, а потім у сухому вигляді змішують. Крім того, існує *комбінований спосіб*

виробництва сухих сумішей для дитячого харчування, який містить елементи вологого та сухого перемішування.

В усіх трьох випадках мікробіологічний контроль інгредієнтів є дуже важливим. Контамінація сухих молочних сумішей для дитячого харчування бактеріями *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) під час виробництва можлива в таких випадках:

- через інгредієнти, які не піддавали відповідному термічному обробленню (у випадку сухого перемішування та при комбінованому способі виробництва сумішей);
- із технологічного обладнання під час сушіння (контамінація після термічного оброблення) як готової суміші, так і окремих інгредієнтів та під час фасування готових сумішей (у випадку сухого, вологого перемішування та при комбінованому способі виробництва сумішей).

З метою попередження контамінації сухих молочних сумішей для дитячого харчування бактеріями *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter spp.*) та зниження мікробіологічного ризику через контроль інгредієнтів, необхідно враховувати такі моменти:

- деякі інгредієнти мають високий ризик вмісту бактерій родини *Enterobacteriaceae*, зокрема *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) – це крохмаль, тоді як інші інгредієнти навпаки мають низький ризик щодо цих мікроорганізмів – олії (табл. 5.8);
- вибір виробника інгредієнтів для сумішей (належний контроль гігієни на підприємстві з виробництва інгредієнтів);
- перевірка інгредієнтів перед використанням;
- відповідне термічне оброблення інгредієнтів згідно з технологічними процесами.

Таблиця 5.8 – Наявність загальної кількості бактерій родини *Enterobacteriaceae* та *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) в інгредієнтах, що використовуються для виробництва сухих молочних сумішей для дитячого харчування віком до трьох років (за даними ФАО)

Інгредієнт	Кількість досліджуваних проб	Із них позитивні щодо	
		<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Cronobacter spp.</i> (<i>E. sakazakii</i>)
Вітаміни	793	8	0
Сухе молоко знежирене	835	1	1
Цукроза	1 691	28	0
Лактоза	2 219	70	2
Лецитин	136	1	1
Банановий порошок	105	3	1
Апельсиновий порошок	61	1	1
Крохмаль	1 389	155	40

Гігієнічний стан технологічного обладнання. Якість і безпека молочних продуктів залежить від належного миття та дезінфекції технологічного обладнання. Залишки молока (жир, білок), що залишилися на молочному технологічному обладнанні після незадовільного миття та дезінфекції, є хорошим поживним середовищем для мікроорганізмів та утворення біоплівки. Біоплівки – це біологічні утвори або скупчення мікроорганізмів на поверхні технологічного обладнання і є захисною формою на несприятливу дію мийно-дезінфікуювальних речовин. Кути, тріщини, прокладки, клапани, стики є сприятливим місцем для накопичення молочних залишків та утворення біоплівки.

Проектування технологічного обладнання та підбір матеріалу мають вирішальне значення в боротьбі з утворенням біоплівки. Біоплівки в молочній промисловості характеризуються перевагою одного виду бактерій над іншими. Наприклад, перевага термофільних бактерій та спорових форм над іншими.

Готовий продукт до споживання. Важливим моментом на цьому етапі є попередження або недопущення потрапляння мікроорганізмів в готовий продукт та контроль за ростом і розмноженням бактерій, що є в ньому. Це можливо лише у разі дотримання температури та термінів зберігання готового продукту. Крім того, неабияке значення має гігієна приготування та споживання продуктів у домашніх умовах [252, 253].

Отже, з метою попередження мікробіологічного ризику *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) під час виробництва сухих молочних продуктів для дитячого харчування необхідно контролювати такі моменти:

- здоров'я тварин (дійних корів);
- дотримання гігієни під час доїння корів;
- дотримання термічного оброблення молока;
- попередження післяпастеризаційної контамінації молока (виробнича та особиста гігієна працівників молокопереробного підприємства);
- належні умови зберігання готової продукції;
- дотримання гігієни приготування та споживання продукту в домашніх умовах.

Контроль за виробництвом сухих молочних продуктів для дитячого харчування стосовно бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*). У цьому розділі акцентується увага на таке актуальне питання для нашої держави в галузі безпечності харчових продуктів, як удосконалення контролю за виробництвом сухих сумішей для новонароджених дітей. В Україні дитячому харчуванню приділяється велика увага, як із боку держави, так і з боку виробників, оскільки ці продукти призначені для особливо вразливої групи населення. Міністерство охорони здоров'я України висловило велику

стурбованість із приводу того, що більше ніж 60 % новонароджених замість грудного вигодовування зростають на сухих молочних сумішах. Від якості харчування малюків залежить їх стан здоров'я. Останніми роками з'явилися повідомлення в наукових виданнях, а також у харчовому законодавстві ЄС та СОТ про те, що сухі молочні суміші можуть спричинити важкі захворювання в немовлят та призводити до раптової смертності. Причиною цього є такий патогенний мікроорганізм, як *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*, який був виділений із сухих сумішей для дитячого харчування [199, 226, 252, 253, 256, 257, 259, 361, 395]. У зв'язку з цим міжнародною законодавчою організацією з харчових продуктів – Комісією з Кодекс Аліметаріус розроблено ряд стандартів щодо посилення контролю за виробництвом дитячих харчових продуктів [379]. На міжнародному рівні чинні відповідні директивні документи, що регламентують здійснювати належний контроль за виробництвом сухих дитячих продуктів як самими виробниками, так і контролюючими органами [379]. Обов'язковим є виробничий контроль, що базується на принципах системи НАССР. У нашій країні на сьогодні ще не розроблені нормативні документи щодо контролю бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*, але активна робота щодо їх запровадження вже ведеться [2, 3, 4]. Взагалі цей мікроорганізм вважається новим і невідомим патогеном в Україні і його дослідженню необхідно приділити особливу увагу. Оскільки індикація та ідентифікація бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* досить трудомістка і тривала в часі, для постійного виробничого контролю на підприємствах з виробництва дитячого харчування Регламентом Комісії ЄС 2073/2005 «Мікробіологічні критерії для харчових продуктів» від 15 листопада 2005 р. (Commission Regulation (EC) 2073/2005 of 15.11.2005 on microbiological criteria for foodstuff) рекомендовано проводити контроль санітарного стану підприємства на основі визначення мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae*, до якої входить вищезазначений мікроорганізм [97, 379].

Тому ми визначили потенційні шляхи контамінації сухих дитячих сумішей мікроорганізмами родини *Enterobacteriaceae*, механізм та встановлення можливості їх використання для контролю санітарного стану на підприємстві.

Ми проаналізували шляхи, що можуть нести потенційну загрозу щодо контамінації сухих молочних сумішей від *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*. Шляхи потрапляння цих мікроорганізмів до сухих дитячих продуктів дуже різноманітні. Щоб оптимізувати вивчення цих шляхів та налагодити дієвий контроль за чинниками, що можуть бути ризиком для контамінації сухих дитячих сумішей *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*, використовували методологію, яка формулюється як контроль за небезпеками в усіх ланках харчового ланцюга «від ферми до столу». В цій методології передбачено аналіз та формування всього харчового ланцюга виробництва харчового продукту. Жоден із потенційних небезпечних чинників у цьому ланцюзі не повинен бути ігнорованим [4, 5, 6, 7].

Установлено, що існує три основні шляхи потрапляння *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* в сухі суміші для дитячого харчування:

- 1) з неякісними або контамінованими цим мікроорганізмом сировиною та інгредієнтами, які використовують для виробництва сухих молочних продуктів для дітей;
- 2) під час технологічного процесу (післяпастеризаційне контамінування, із доквілля (з повітря, з обладнання), при порушенні умов пакування та зберігання);
- 3) при порушенні гігієнічних правил під час приготування продукту до вживання в домашніх умовах чи на дитячих молочних кухнях [6].

Правильно розроблений план відбору проб та правильно відібрані ці проби, їх дослідження є одним із ефективних методів контролю виробництва безпечної продукції та дає можливість виявити ефективність заходів щодо знищення або зменшення до мінімуму наявності мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae*, зокрема *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*. Такі плани відбору проб не є ідентичними щодо різних видів мікроорганізмів, а є гнучкими

залежно від одержаного результату. Також ці плани відбору проб відрізняються серед виробників однієї продукції за частотою та кількістю відібраних проб. Показаннями для відхилення у плані відбору проб є підвищення мікробіологічного ризику, в такому випадку збільшується кількість та об'єм відібраних зразків.

Під час виробництва сухих молочних продуктів здійснюють відбір:

- інгредієнтів для дитячого харчування;
- готової продукції;
- змивів із технологічних поверхонь, які доторкуються до продукту

на критичних етапах.

Згідно з вимогами Регламенту Комісії ЄС 2073/2005 «Мікробіологічні критерії для харчових продуктів» виробник та представники органів контролю повинні користуватися методологією системи НАССР при забезпеченні відповідності до мікробіологічних норм харчових продуктів. У цій директиві зазначено, що виробники повинні впровадити систему НАССР, а відповідальні особи, які контролюють, повинні перевіряти її ефективність. Відповідно до вимог зазначеної директиви при виробництві сухих дитячих сумішей обов'язково умови виробництва повинні перевірятися на наявність мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae*. За результатами досліджень необхідно також проводити аналіз та встановлювати динаміку виявлення цих мікроорганізмів. За несприятливих тенденцій у результатах досліджень необхідно проводити визначення *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) і розробити та використовувати спеціальний «ключ», так зване «дерево рішень» [4, 5, 7]. Нижче наводиться «дерево рішень», яке необхідно використовувати для визначення випадків, в яких проводяться дослідження на *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*).

Схема «дерева рішень» наглядно демонструє виробникові, а також офіційній особі, яка контролює, в яких випадках необхідно готовий продукт вилучати з обігу, в яких випадках продукт повинен піддаватися більш

розширеним лабораторним дослідженням та в яких може безперешкодно реалізуватися споживачам.

Згідно з вимогами Директиви ЄС 2073/2005 виробник та представники контролю повинні користуватись методологією системи НАССР при забезпеченні відповідності до мікробіологічних норм харчових продуктів. У цій Директиві зазначено, що виробники повинні впровадити систему НАССР, а відповідальні особи, які контролюють, повинні перевіряти її ефективність. Відповідно до вимог зазначеної Директиви, під час виробництва сухих дитячих сумішей обов'язково умови виробництва повинні перевірятися на наявність мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae*. За результатами досліджень необхідно також аналізувати та встановлювати динаміку виявлення цих мікроорганізмів. За несприятливих тенденцій у результатах досліджень необхідно проводити визначення *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*. Кожен виробник сухих продуктів повинен розробити та використовувати спеціальний «ключ», так зване «дерево рішень». Нижче наводиться «дерево рішень», яке необхідно використовувати для визначення випадків, в яких проводяться дослідження на *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*.

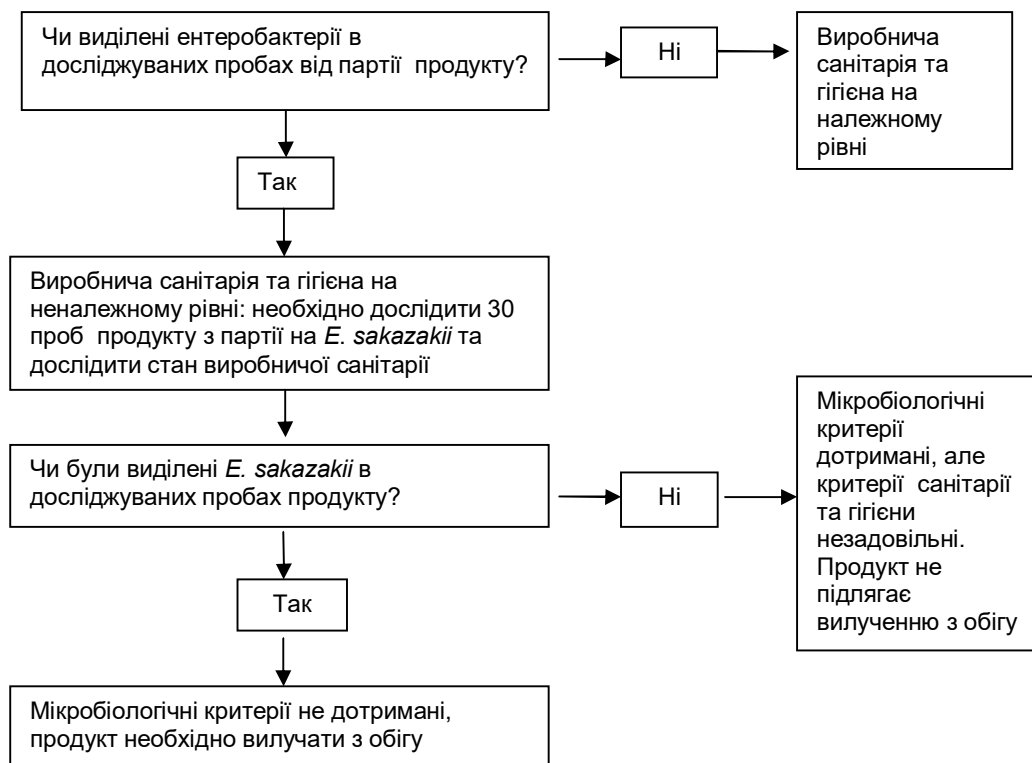


Рисунок 5.8 – «Дерево рішень» для прийняття рішень щодо результатів контролю сухих дитячих продуктів на наявність мікроорганізмів родин *Enterobacteriaceae* та *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*

Міжнародний Комітет Кодексу Аліментаріус із гігієни харчових продуктів у 2007 році запропонував нові міжнародні наукові рекомендації по санітарно-гігієнічній практиці виробництва харчових продуктів для дітей раннього віку [379]. Необхідність у таких рекомендаціях з'явилася після ряду спалахів захворювань серед малюків, що вживали дитячі суміші. Перебіг захворювання характеризувався проявом ознак сепсису, ентероколіту та менінгіту. Учені встановили причину виникнення таких симптомів – це харчове отруєння сухими дитячими харчовими продуктами, які містили бактерії виду *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*. Важливим є те, що найбільш сприйнятливою до цього отруєння є особлива група населення – це новонароджені малюки та немовлята віком до 1 року.

У зв'язку з цим Міжнародний Комітет Кодексу Аліментаріус закликає держави-члени тісно співпрацювати науковцям із виробниками для

попередження виникнення та поширення патогенних мікроорганізмів, зокрема такого патогену як *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*, через сухі молочні продукти для дитячого харчування. Дуже актуальним у цьому випадку є вивчення можливих шляхів зниження ріння вмісту вищезазначеного мікроорганізму в сухих молочних сумішах для дітей. Необхідно також розробляти стандарти, регулювальні документи, методичні рекомендації із безпечності харчових продуктів для дітей. Оскільки це захворювання у дітей пов'язане з вживанням харчових продуктів, міжнародні організації рекомендували виробникам провести коригування їх НАССР-планів для вирішення зазначеної проблеми. Науковці на підставі аналізу власних досліджень повинні надавати консультації виробникам щодо заходів, які б могли успішно використовуватися для попередження виникнення захворюваності, спричиненої *Enterobacter sakazaki*. Офіційні лікарі ветеринарної медицини, що працюють на таких підприємствах, повинні контролювати правильність функціонування системи НАССР.

Для запобігання контамінації дитячих сумішей *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* під час їх виробництва особливу увагу необхідно приділяти питанням забезпечення виробників дитячого харчування якісною сировиною. Важливим є також створення нормативної бази з розроблення продуктів здорового харчування дітей різних вікових груп.

Для ефективної оцінки ризику *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* експерти ФАО/ВОЗ зробили висновок щодо необхідності тісної співпраці між науковцями, виробниками та офіційними особами, які контролюють виробництво продукції в галузі оцінки ризику. Оцінки мікробіологічного ризику (ОМР) має свої особливості та методологічні підходи. Ці підходи використовуються як у країнах ЄС, так і в країнах-учасниках СОТ. У кожній країні повинні бути встановлені національні наукові дані щодо ОМР. Для ефективної оцінки ризику використовують модель, що включає весь харчовий ланцюг від первинного виробництва до споживача. Схематично параметри менеджменту ризику логічно внести до такої моделі:

$PC - PO - FSO = ALOP$,

де PC – (Performance criteria) – критерії виконання, що означають частоту виявлення та/або концентрацію небезпечного фактора в продукції, що повинно бути досягнуто шляхом застосування одного чи декількох контрольних меж для досягнення значень PO та FSO;

PO – (Performance Objectives) – завдання щодо виконання, або цілі виконання, що означають максимальну частоту виявлення та/або концентрацію небезпечного фактора в продукції на виробничих процесах усього харчового ланцюга, показники PO більш жорсткі, ніж показники FSO.

Показники PO та PC використовуються у виробничому процесі для встановлення відповідності внутрішньої системи безпечності харчових продуктів. Показники PO та PC використовуються в точках контролю в ланцюзі виробництва харчових продуктів, де застосовуються заходи контролю та їх перевірка за допомогою мікробіологічних критеріїв гігієни виробничого процесу та критеріїв гігієни харчових продуктів;

FSO – (Food Safety Objectives) – цілі щодо безпечності харчових продуктів, які означають максимальну частота виявлення та/або концентрацію небезпечного фактора під час споживання, сприяє досягненню вимог ALOP. Показник FSO використовується як офіційний показник для заходів контролю;

ALOP – рівень профілактики захворюваності на рівні держави, що базується відповідно до вимог угоди «Про санітарні та фітосанітарні бар'єри торгівлі» (Угода SPS).

Зазначений методологічний підхід сприяє покращанню дотримання норм контролю за безпечністю харчових продуктів, що дає можливість проводити належну перевірку виробництва продукції шляхом використання системи показників. OMP забезпечує цінну інформацію про складну динаміку поведження патогену та їх передавання харчовим ланцюгом. Належним чином проведена OMP є засобом для оцінки заходів та контролю ризиків для споживачів. Таким чином, OMP та інші вищезазначені інструменти відіграють важливу роль в управлінні ризиком для забезпечення безпечності харчових

продуктів. На жаль, в Україні вищезазначені методологічні підходи ще не використовуються, але використання їх для забезпечення безпечності харчових продуктів у країнах ЄС та СOT є обов'язковим. Отже, вивчення нової міжнародної методології оцінки ризику для забезпечення безпечності харчових продуктів є дуже актуальним питанням.

Відповідно до міжнародних вимог для здійснення менеджменту мікробіологічної безпечності харчових продуктів необхідно забезпечувати наукове підґрунтя для таких параметрів, як:

- FSOs, (FSOs – Food Safety Objectives) – цілі для забезпечення безпечності харчових продуктів;
- мікробіологічні критерії, що формують основу менеджменту мікробіологічної безпечності виробництва харчових продуктів.

На жаль, серед виробників та науковців на сьогодні немає чіткої уяви щодо вищезазначених параметрів, тому ми надаємо характеристику цим показникам (табл. 5.9).

Таблиця 5.9 – Характеристика FSOs та мікробіологічних критеріїв

Мета для забезпечення безпечності харчових продуктів (FSOs – Food Safety Objectives)	Мікробіологічний критерій (Microbiological Criterion)
1	2
Виробничі нормативи для забезпечення виробництва харчових продуктів із прийнятним рівнем мікро-організмів	Офіційний норматив, який визначає придатність харчового продукту чи партії продукту
Установлюються виробником із залученням наукових консультантів	Установлюються офіційно на підставі результатів наукових досліджень
Застосовується до виробничого процесу	Застосовується до певної партії чи вантажу харчового продукту

Продовження таблиці 5.9

1	2
<p>Складові:</p> <ul style="list-style-type: none"> • максимальна частота виявлення; • кількісний аналіз мікробіологічного ризику 	<p>Складові :</p> <ul style="list-style-type: none"> • мікроорганізм, що становлять інтерес та/або їх токсини/метаболіти; • план відбору проб; • метод дослідження; • мікробіологічні ліміти; • кількість досліджуваних проб, що повинні відповідати встановленим лімітам
<p>FSO можуть бути використані для встановлення мікробіологічних критеріїв</p>	<p>Мікробіологічні критерії не можуть бути використані для встановлення FSO</p>
<p>Використовується лише для забезпечення безпечності харчових продуктів</p>	<p>Використовується для встановлення безпечності харчових продуктів або для характеристики показників якості</p>
<p>Базуються на підтвердженні менеджерів ризику щодо існування гарантії безпечності харчового продукту</p>	<p>Базуються на FSO або на підтвердженні менеджерів ризику щодо існування гарантії безпечності харчового продукту, або того, що харчовий продукт буде прийнятним для внутрішнього використання</p>
<p>Може використовуватися для внесення змін в умови виробництва харчових продуктів із метою покращання показників їх безпечності</p>	<p>Може використовуватися для внесення змін у виробничі процеси щодо конкретних партій чи вантажів, щоб забезпечити відповідність до установлених мікробіологічних критеріїв</p>
<p>Дуже придатний для оцінки ефективності системи безпечності харчових продуктів на виробництві</p>	<p>Не дуже придатний для оцінки безпечності харчових продуктів виробництва. Відбір проб від партії в процесі виробництва забезпечує оцінку рівня виробничого контролю на момент відбору проб, але не може забезпечувати гарантії в цьому щодо минулих та попередніх партій</p>
<p>Високий рівень довіри до виробництва забезпечується у разі, якщо виробничі процеси налаштовані та валідовані щодо їх відповідності FSO</p>	<p>Рівень довіри до виробництва менший, якщо FSO не встановлені та не використовуються і коли виробничі процеси не налаштовані та валідовані щодо їх відповідності мікробіологічних критеріїв</p>

Звідси випливає, що сучасний контроль та нагляд за виробництвом харчових продуктів необхідно здійснювати відповідно до чинного міжнародного харчового законодавства з використанням елементів менеджменту безпеки. До основних елементів менеджменту безпеки харчових продуктів відносять: систему HACCP та «моніторинг», «верифікацію» та «валідацію», а до елементів менеджменту мікробіологічної безпеки харчових продуктів, крім вищезазначеного, необхідно застосовувати такий показник, як FSO. Мікробіологічні критерії для продовольчої сировини та харчових продуктів, установлені Регламентом Комісії ЄС 2073/2005, вважаються одними з основних показників у менеджменті мікробіологічної безпеки.

Отже, підсумовуючи результати дослідження, можна зробити висновок. Оцінювання мікробіологічного ризику *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* – це процес, що базується на наукових даних і комплексі чотирьох методів:

1) ідентифікації *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*; 2) визначенні характеристик *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*; 3) оцінюванні експозиції (або очікуванні) *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* та 4) визначенні характеристик ризику *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* (рис. 5.9).

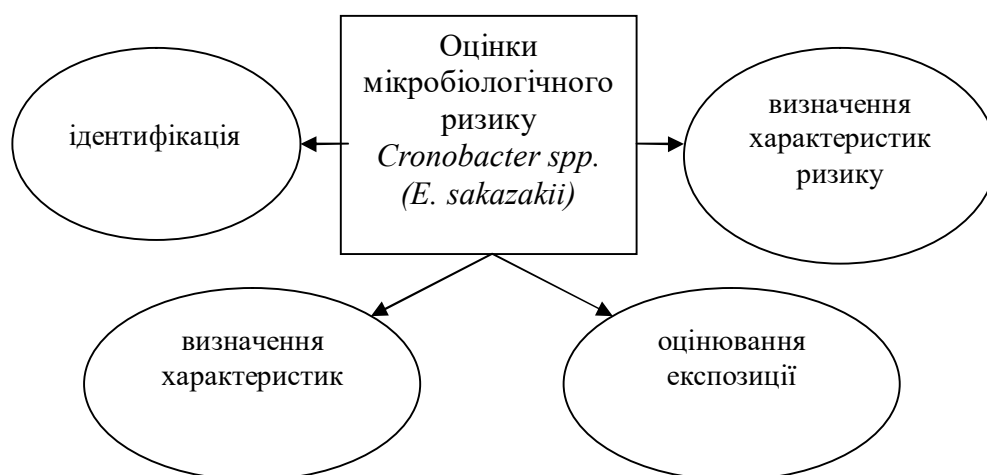


Рисунок 5.9 – Оцінювання мікробіологічного ризику *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter spp.*)

1. *Ідентифікація або виявлення мікроорганізму* передбачає виявлення характерних ознак для певного виду збудника і проводиться за їх морфологічними, культуральними властивостями та за біохімічними показниками.

Основними характерними ознаками для ідентифікації бактерій *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* є грам-негативна, не спороутворювальна, рухлива паличка, що належить до родини *Enterobacteriaceae*, факультативний анаероб, який утворює колонії з жовтим пігментом на триптон-соєвому агарі. Температурні межі росту цього мікроорганізму сягають від 5–8 до 41–45 °С (оптимальна температура становить 37–44 °С). Характерні колонії, що утворюють жовтий пігмент на триптон-соєвому агарі, досліджують за біохімічними властивостями. Бактерії *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* на відміну від інших представників родини ентеробактерій є глюкозидазопозитивні та D-сорбітол негативні.

2. *Визначення характеристик мікроорганізму* – це кількісне та/чи якісне оцінювання характеру несприятливих наслідків для здоров'я людини, пов'язане з наявністю мікроорганізмів у продуктах. При цьому визначають характер поширенню захворювання (спорадичний, епізодичний, епідеміологічний), характерні симптоми, летальність.

Захворювання, спричинене *Cronobacter spp. (E. sakazakii)*, має спорадичний характер і характеризується сепсисом, менінгітом та неонатальним некротичним ентероколітом. Летальність сягає від 30–50 % (в окремих випадках – до 80 %). Найбільш уразливими до інфекції є новонароджені діти (віком до 1 міс.), недоношені (< 2 500 г) або з недостатньою масою тіла при народженні та народжені від ВІЛ-інфікованих матерів. Діти віком до 1 року, які перебувають на штучному вигодовуванні, теж у групі ризику.

3. *Оцінювання експозиції (впливу)* – це кількісне оцінювання ймовірного потрапляння в організм людини певного виду мікроорганізму шляхом вживання певного продукту. Оцінювання експозиції *Cronobacter spp.*

(*E. sakazakii*) передбачає аналіз впливу дози та терміну (часу) вживання, що спричинили захворювання при згодовуванні дітям віком 1 до року сухих молочних сумішей, і проводять його шляхом аналізу епідеміологічних даних та наукових досліджень. Епідеміологічні дані передбачають аналіз впливу різних доз молочних сумішей на проявлення захворювання в дітей. Для визначення експозиції проводять також наукові дослідження на лабораторних тваринах.

4. *Визначення характеристик ризику* – це процес визначення кількісного та/чи якісного оцінювання ймовірності настання та ступеня тяжкості неблагополучних наслідків для здоров'я певної категорії населення на підставі ідентифікації мікроорганізму, визначення його характеристик та оцінювання експозиції і проводять за критеріями істотності негативного впливу (табл. 5.10).

Таблиця 5.10 – Критерії оцінювання можливості істотності негативних впливів *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) на здоров'я дітей

Наслідки для здоров'я дитини	Ступінь істотності наслідків	Шкала оцінювання
Смертельний випадок	Критичний	1 бал
Тяжке захворювання, що потребує госпіталізації або загрожує інвалідністю	Високий	2 бали
Захворювання, що має тимчасовий перебіг	Середній	3 бали
Легке нездужання	Низький	4 бали

Оцінювання мікробіологічного ризику до споживання сухих молочних продуктів для дітей раннього віку повинно проводитися першочергово на науковому аналізі з використанням прогнозованого моделювання та оцінки правильності функціонування системи НАССР на підприємстві. Особливо важливим є наукове вивчення та аналіз поведінки мікроорганізмів у харчовому продукті під дією різних чинників на початку та в кінці його терміну гарантованої придатності.

Отже, вищенаведене є достатньою підставою для запровадження в Україні вимог дотримання нових мікробіологічних критеріїв при виробництві сухих

молочних продуктів для дітей раннього віку щодо недопущення бактерій *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter spp.*) у 10 г готового продукту.

Крім того, оцінювання мікробіологічного ризику *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*) необхідно використовувати разом із науковими даними для встановлення мікробіологічних критеріїв щодо цього мікроорганізму в сухих молочних продуктах для дитячого харчування та проводити в таких галузях: ветеринарній медицині, гуманній медицині, харчових технологіях.

При оцінюванні мікробіологічного ризику важливим є визначення його якісних та кількісних характеристик. Якісна оцінка ризику – це оцінка, яка дає можливість класифікувати ризики або поділяти їх за характерними показниками. Кількісна оцінка – це оцінка, яка надає кількісне вираження ризику та детально розглядає динаміку мікробіологічного росту, виживання та загибель мікроорганізмів у продукті під впливом різноманітних параметрів довкілля і розглядає взаємодію (враховуючи ускладнення) між людиною і вживаним продуктом та потенціал подальшого поширення.

Саме прогнозуюча мікробіологія є ймовірність альтернативою традиційним та швидким сучасним мікробіологічним методам саме при кількісній оцінці мікробіологічних ризиків.

Прогнозуюча мікробіологія – це мультидисциплінарна наука, що комбінує в собі математичне модулювання з експериментальними даними, що ґрунтується на факторах, які впливають на ріст, резистентність, загибель мікроорганізмів. Крім математичних підходів у прогнозуючій мікробіології, використовують мікробіологічні та хімічні методи досліджень.

Саме в блоці «Оцінка впливу (експозиції)» застосовують математичні моделі прогнозуючої мікробіології для встановлення ступеня реальної або очікуваної дії на людину (споживача).

При оцінці мікробіологічного ризику з використанням математичних моделей прогнозуючої мікробіології необхідно дотримуватися послідовності, наведеної на рис. 5.10.



Рисунок 5.10 – Використання математичних моделей прогнозуючої мікробіології при встановленні кількісної оцінки мікробіологічного ризику

Отже, прогнозуюча, або предиктивна, мікробіологія пов'язана із вивченням фізіології мікроорганізмів при різних параметрах довкілля, що так необхідно для оцінки мікробіологічних ризиків продуктів харчування та забезпечення їх безпеки згідно з міжнародним вимогами. Тому поряд із лабораторними навичками досліджень продуктів харчування необхідні і знання новітніх підходів із прогнозуючої мікробіології.

Ми також проаналізували фактори ризику від контамінації бактеріями *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* в ланках харчового ланцюга виробництва сухих молочних продуктів в для дитячого харчування. Дані наведені в таблиці 5.11.

Таблиця 5.11 – Основні фактори ризику від *Cronobacter spp. (E. sakazakii)* у ланках харчового ланцюга виробництва сухих молочних продуктів для дитячого харчування

Етап	Фактор ризику	
	1	2
Молочна ферма	Фекальна контамінація	Брудна шкіра тіла та вим'я дійних корів
	Гігієнічний стан молочного обладнання	Незадовільне миття та дезінфекція, що призводить до появи біоплівки та накопичення і розмноження бактерій
	Потрапляння із зовнішнього середовища (з корму, повітря, води)	Зберігання сирого молока у відкритих ємностях
	Стан здоров'я тварин	Мастит
	Обслуговуючий персонал	Брудні руки працівників
Зберігання та транспортування сирого молока	Розмноження бактерій у сирому молоці	Тривале зберігання та транспортування молока за підвищених температур (+ 8 °C)
	Розмноження бактерій на молочному обладнанні	Незадовільне миття та дезінфекція
Приймання та проміжне зберігання сирого молока на молокоприймальному пункті	Додаткова контамінація від обладнання, що використовується для перемішування сирого збірного молока в молоко цистерни та при відборі проб для лабораторного дослідження	Незадовільне миття та дезінфекція
	Додаткова контамінація від рук працівників	Незадовільне миття
	Розмноження бактерій у сирому молоці	Тривале зберігання молока за підвищених температур (+ 8 °C)
Пастеризація	Вживання мікроорганізмів у молоці після пастеризації	Дотримання режимів термічної оброблення
	Післяпастеризаційна контамінація	Незадовільне миття та дезінфекція технологічного обладнання

Продовження табл. 5.11

1	2	3
Технологічний процес	Гігієнічний стан технологічного обладнання	Незадовільне миття та дезінфекція, що призводить до появи біоплівки та накопичення і розмноження бактерій
	Додавання інгредієнтів	Наявність збудника в інгредієнтах
Готовий продукт	Контроль готового продукту	Збудник не росте в сухих субстратах, проте довгий час зберігає свою життєдіяльність у них
	Післятехнологічна контамінація	Дотримання умов зберігання, фасування та реалізації готового продукту

Ми визначили такі основні етапи в мікробіологічному контролі харчового ланцюга від «лану до столу» при виробництві сухих молочних продуктів для дитячого харчування стосовно бактерій *Cronobacter spp.* (*E. sakazakii*):

- здоров'я тварин та дотримання гігієни при доїнні;
- дотримання термічного оброблення молока та попередження післяпастеризаційної контамінації молока (виробнича та особиста гігієна працівників молокопереробного підприємства);
- контроль інгредієнтів та параметрів технологічного процесу;
- контроль готової продукції та належні умови її зберігання і реалізації.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Акименко Е. А. Внедрение системы управления безопасностью пищевой продукции / Е. А. Акименко // Стандарты и качество. – 2008. – № 2. – С. 90–92.
2. Алексеев А. Н. Применение нейронных сетей для прогнозирования качества стереографических изображений в электронных учебниках / А. Н. Алексеев // Вісник Сумського національного аграрного університету. Серія «Харчові технології». – 2008. – Вип. 9. – С. 10–13.
3. Апанасенко С. И. Системы регулирования показателей качества пищевых продуктов на основе нейросетевых алгоритмов / С. И. Апанасенко, М. М. Благовещенская // Реология и физико-химическая механика гетерофазных систем. – 2009. – С. 65–67.
4. Апанасенко С. И. О построении системы регулирования показателей качества пищевых продуктов с применением нейронных сетей / С. И. Апанасенко, М. М. Благовещенская // Экологически безопасные, ресурсосберегающие технологии и средства переработки сельскохозяйственного сырья и производства продуктов питания. – 2009. – С. 157–159.
5. Баскин И. И. Применение искусственных нейронных сетей в химических и биохимических исследованиях / И. И. Баскин, В. А. Палюлин, Н. С. Зефирова // Вестн. Московского ун-та. Серия 2. «Химия». – 1999. – Т. 4, № 5 – С. 323–326.
6. Безопасное приготовление, хранение и обращение с сухой детской смесью. Руководящие принципы: за данными Всемирной Организации Здравоохранения и Продовольствия, Сельскохозяйственной организации ООН [Электронный ресурс]. – 2007. – 32 с. – Режим доступа : www.who.int/foodsafety.
7. Бергілевич О. М. Прогнозуюча мікробіологія є основою для безпеки продуктів харчування / О. М. Бергілевич // Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій ім. С. З. Гжицького. – 2008. – Т. 10, № 2 (37), ч. 4. – С. 3–7.
8. Бергілевич О. М. Використання прогнозуючої мікробіології при оцінці мікробіологічного ризику / О. М. Бергілевич // Вісник Сумського національного аграрного університету. Серія «Ветеринарна медицина». – 2008. – Вип. 9/1 (21). – С. 11–13.
9. Бергілевич О. М. Обґрунтування необхідності дотримання нових мікробіологічних критеріїв при виробництві сухих молочних продуктів / О. М. Бергілевич, В. В. Касянчук // Проблеми зооінженерії та ветеринарної

медицини : зб. наук. праць Харківської державної зооветеринарної академії. Серія «Ветеринарні науки». – 2009. – Вип. 19, ч. 2, т. 1. – С. 266–271.

10. Бергілевич О. М. Методологічні підходи щодо оцінки мікробіологічного ризику *Enterobacter sakazakii* / О. М. Бергілевич // Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій ім. С. З. Гжицького. – 2009. – Т. 11, № 2 (41), ч. 4. – С. 3–7.

11. Бергілевич О. М. Вивчення поширення мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* в сирому молоці та об'єктах молочної ферми / О. М. Бергілевич // Науковий вісник ветеринарної медицини Білоцерківського НАУ. – 2009. – Вип. 62. – С. 10–13.

12. Бергілевич О. М. Застосування принципів та методів прогнозуючої мікробіології при контролюванні безпечності харчових продуктів тваринного походження / О. М. Бергілевич // Науковий вісник Луганського НАУ. Серія «Ветеринарні науки». – 2009. – № 4. – С. 10–12.

13. Бергілевич О. М. Вдосконалення контролю за мікробіологічними небезпеками в продовольчій сировині та харчових продуктах шляхом застосування прогнозуючого моделювання / О. М. Бергілевич // Міжвідомчий тематичний науковий збірник «Ветеринарна медицина» УААН, ННЦ «Інститут експериментальної та клінічної ветеринарної медицини». – 2010. – № 93. – С. 38–42.

14. Бергілевич О. М. Значення мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* в безпечності сухих молочних сумішей для дитячого харчування / О. М. Бергілевич // Проблеми зооінженерії та ветеринарної медицини : зб. наук. праць Харківської державної зооветеринарної академії. Серія «Ветеринарні науки». – 2010. – Вип. 21 (2), т. 3. – С. 203–209.

15. 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.

16. Бергілевич О. М. Використання системи показників для управління мікробіологічним ризиком щодо *Enterobacter sakazakii* при виробництві сухих молочних сумішей для дітей / О. М. Бергілевич // Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій ім. С. З. Гжицького. Серія «Харчові технології». – 2010. – Т. 12, № 3 (45), ч. 4. – С. 107–112.

17. Бергілевич О. М. Оцінка мікробіологічного ризику *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter spp*) в харчовому ланцюзі виробництва сухих молочних продуктів для дитячого харчування / О. М. Бергілевич // Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України. Серія

«Ветеринарна медицина, якість і безпека продукції тваринництва». – 2010. – Вип. 151, ч. 2. – С. 312–317.

18. Бергілевич О. М. Характеристика ризику стосовно *Enterobacter sakazakii* для молока гатунку «екстра» / О. М. Бергілевич // Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій ім. С. З. Гжицького. Серія «Харчові технології, ветеринарні науки». – 2011. – № 4 (50), т. 13, ч. 4. – С. 167–170.

19. Бергілевич О. М. Управління мікробіологічними ризиками у харчовому ланцюгу виробництва сирого молока гатунку екстра / О. М. Бергілевич // Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України. Серія «Ветеринарна медицина, якість і безпека продукції тваринництва». – Київ, 2011. – Ч. 1, вип. 167. – С. 12–18.

20. Бергілевич О. М. Вивчення терморезистентності бактерій *E. sakazakii* для розробки заходів управління процесом пастеризації молока для гарантування його безпечності / О. М. Бергілевич, В. В. Касянчук // Аграрний вісник Причорномор'я : збірник наукових праць Одеського державного аграрного ун-ту. Серія «Ветеринарні науки». – Одеса, 2011. – Вип. 59. – С. 10–13.

21. Бергілевич О. М. Теоретичне обґрунтування та розроблення виробничих мікробіологічних критеріїв при виробництві сирого збірного молока корів / О. М. Бергілевич, В. В. Касянчук // Проблеми зооінженерії та ветеринарної медицини : зб. наук. праць Харківської державної зооветеринарної академії. Серія «Ветеринарні науки». – 2012. – Вип. 24, ч. 2. – С. 364–367.

22. Бергілевич О. М. Використання нейронних мереж для прогнозування росту та розмноження мікроорганізмів в молочній сировині під час її зберігання охолодженою / О. М. Бергілевич, В. В. Касянчук, О. О. Бергілевич // Вісник Сумського національного аграрного університету. Серія «Ветеринарна медицина». – 2012. – Вип. 1 (30). – С. 56–61.

23. Бергілевич О. М. Вплив режимів пастеризації на кількість мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* в технології пастеризованого питного молока / О. М. Бергілевич, В. В. Касянчук // Збірник наукових праць Вінницького НАУ. Серія «Сільськогосподарські науки». – 2013. Вип. 2 (72). – С. 145–149.

24. Бергілевич О. М. Характеристика ступенів ризику стосовно бактерій *Enterobacter sakazakii* в молоці корів після пастеризації / О. М. Бергілевич, В. В. Касянчук // Вісник Сумського національного аграрного університету. Серія «Ветеринарна медицина». – 2013. – Вип. 2 (32). – С. 46–50.

25. Бергілевич А. Н. Характеристика мікробіологічного ризика *Enterobacter sakazakii* в сиром молоке / А. Н. Бергілевич // Scientific Journal “ScienceRise”. – 2014. – Vol. 5/4 (5). – P. 54–61.
26. Бергілевич О. М. Основні мікробіологічні ризики при оцінці санітарно-гігієнічного стану виробництва молока на фермах / О. М. Бергілевич, В. В. Касянчук, Є. А. Гришина, О. В. Терьохіна // Вісник Сумського НАУ. Серія «Ветеринарна медицина». – 2014. – Вип. 6 (35). – С. 94–98.
27. Бергілевич О. М. Новий мікробіологічний ризик у сухих молочних сумішах для дітей – бактерія *Enterobacter sakazakii* / О. М. Бергілевич // Молочна індустрія. – 2014. – № 2. – С. 20–24.
28. Бергілевич А. Н. Использование специфических экологических критериев при осуществлении ветеринарно-санитарного контроля сырого молока на фермах Украины / А. Н. Бергілевич, В. В. Касянчук, А. Н. Марченко, Е. А. Гришина // Белорусская СХ Академия, Горки-2014, XVII Междунар. науч.-практ. конф. УО БГСХА «Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства» 20–30 мая 2014 г. – С. 28–37.
29. Бергілевич О. М. Виявлення та ідентифікація бактерій *Cronobacter spp. (sakazakii)* методом полімеразної ланцюгової реакції / О. М. Бергілевич, В. О. Ушкалов, В. В. Касянчук, О. М. Дерябін, Є. А. Гришина // Вісник СНАУ. Серія «Ветеринарна медицина». – 2015. – Вип. 7 (37). – С. 111–116.
30. Бондаренко В. М. Розвиток ефективного виробництва молока та його промислової переробки в Україні / В. М. Бондаренко // Пропозиція АПК. – 2008. – № 5. – С. 61–64.
31. Бурькина И. М. Качество молочных продуктов – как фактор конкурентоспособности / И. М. Бурькина, В. А. Замуракин, Г. В. Андреева // Переработка молока. – 2011. – № 1. – С. 15–17.
32. Буряк Р. І. Введення до концепції вирішення проблем безпеки продуктів харчування ХАССП (НАССР) / Р. І. Буряк // Наук. вісн. НАУ. – 2007. – Вип. 110. – С. 311–315.
33. Ветеринарні санітарно-гігієнічні правила для господарств з виробництва молока коров'ячого сирого / Я. Й. Крижанівський, І. П. Даниленко, Н. Ф. Моткалюк [та ін.] // Методичні рекомендації, затверджені Науково-методичною радою Державного комітету ветеринарної медицини України. – 2010. – 15 с.
34. Взаимодействие между лицами, проводящими оценки, и управляющими микробиологическими опасностями в пищевых продуктах: доклад о консультации экспертов ВОЗ [Электронный ресурс]. – ФАО/ВОЗ, 2000. – 25 с. – Режим доступа : <http://www.who.int/foodsafety>.

35. Вивчення санітарно-гігієнічних умов виробництва молока на молочних фермах для забезпечення умов належної гігієнічної практики / М. П. Остапюк, В. В. Касянчук, О. М. Бергілевич [та ін.] // Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій ім. С. З. Гжицького. Серія «Харчові технології». – 2010. – Том 12, № 3 (45), ч. 4. – С. 243–248.

36. Визначення відповідності мікробіологічним критеріям харчових продуктів та виробничого процесу шляхом розроблення плану відбору проб / О. М. Бергілевич, В. В. Касянчук, Т. О. Гаркавенко [та ін.] // Ветеринарна медицина України. – 2010. – № 7. – С. 33–36.

37. Власенко І. Г. Сучасний стан контролю якості молочної сировини та перспективи використання комп'ютерних технологій для оцінки біологічної безпеки харчових продуктів в Україні / І. Г. Власенко // Проблеми харчування. – 2006. – № 3. – С. 43–46.

38. Влияние температуры на развитие микроорганизмов в молоке и молочных продуктах / С. А. Емельянов, А. Г. Храмцов, О. А. Суюнчев [и др.] // Вестник Северо-Кавказского государственного технического университета. – 2006. – № 2 (6). – С. 54–57.

39. В центрі уваги: контроль за якістю та безпекою харчової продукції. Аналітичний звіт, підготовлений Комітетом експортерів та імпортерів Європейської Бізнес-асоціації [Електронний ресурс]. – Європейська Бізнес-асоціація. – 2007. – 13 с. – Режим доступу : www.eba.com.ua.

40. Гогоуля О. П. Впровадження системи якості молока і молочних продуктів: досвід Польщі / О. П. Гогоуля, І. П. Кудінова // Економіка АПК. – 2007. – № 1. – С. 140–147.

41. Горбань А. Н. Нейронные сети на персональном компьютере / А. Н. Горбань, Д. А. Россиев. – Москва : Альтаир, 1996. – 214 с.

42. Грищенко Ф. В. Международные нормативные документы в области технологии производства пищевых продуктов: тенденции развития / Ф. В. Грищенко // Пищевая промышленность. – 2009. – № 1. – С. 42–44.

43. Демчук М. В. Гігієна тварин: підруч. [для студ. вищ. навч. закл.] / М. В. Демчук, М. В. Чорний, М. О. Захаренко [та ін.] // – Харків: Еспада, 2006. – 520 с.

44. Демчук М. Гігієна доїння корів та якість молока / М. Демчук, Л. Войтюк // Ветеринарна медицина України. – 2007. – № 4. – С. 40–43.

45. Державні санітарні правила для молокопереробних підприємств: ДСП 4.4.4-011-98. [Електронний ресурс] : Державні санітарні правила і норми. – 1998. – 12 с. – Режим доступу : <http://uazakon.com/documents>.

46. Динаміка загальної кількості мікроорганізмів і психротрофних бактерій у збірному молоці залежно від температури зберігання / О. М. Якубчак, Р. І. Білик, С. М.Ткач [та ін.] // Науковий вісник НАУ. – 2005. – Вип. 89. – С.99–102.
47. Директива ради ЕЕС, що встановлює медико-санітарні правила щодо виробництва та розміщення на ринку сирого молока, теплообробленого молока та продуктів на молочній основі : № 92/46 від 16 червня 1992 року. – [Електронний ресурс]. – 1992. – 15 с. – Режим доступу: http://garmonia-kiev.narod.ru/Directivs/92_46.htm.
48. Діброва Л. В. Гармонізації національної політики якості щодосільськогосподарської продукції до вимог Європейського союзу / Л. В. Діброва // Наук. вісн. НАУ. – 2007. – Вип. 110. – С. 261–265.
49. Долгов В. А. Обеспечение качества и безопасности продуктов животноводства / В. А. Долгов // Ветеринария. – 2005. – №10. – С. 9–11.
50. Донченко Л. В. Международная система обеспечения безопасности пищевой продукции / Л. В. Донченко, В. Д. Надыкта // Безопасность пищевой продукции. – Москва : ДеЛи принт, 2007. – С. 46–53.
51. Емельянов С. А. Микробиологические аспекты использования тепловой обработки молока-сырья / С. А. Емельянов // Вестник Саратовского госагроуниверситета им. Н. И. Вавилова. – 2006. – № 6, Вып. 2. – С. 15–20.
52. Еталонний штам бактерій *Enterobacter sakazakii* M1 : патент України на корисну модель № 60297 / О. М. Бергілевич, В. О. Ушкалов, Л. І. Акименко, Л. М.Виговська ; заявник Сумський НАУ. – Заявл. 04.01.2011 ; опубл. 10.04.2011, Бюл. № 11. – 3 с.
53. Ефимочкина Н. Р. Эмерджентные бактериальные патогены в пищевой микробиологии / Н. Р. Ефимочкина. – Москва : Из-во РАМН, 2008. – 256 с.
54. Ефимочкина Н. Р. Идентификация нового вида патогенных микроорганизмов *Enterobacter sakazakii* с использованием современных таксономических подходов / Н. Р. Ефимочкина // Вопросы питания. – 2009. – Т. 78, № 3. – С. 25–32.
55. Ефимочкина Н. Р. Новые бактериальные патогены в пищевых продуктах: экспериментальное обоснование и разработка системы контроля с применением методов микробиологического и молекулярно-генетического анализа : автореф. дис. на соискание уч. степени д-ра биол. наук : спец. 14.02.01 «Гигиена» / Н. Р. Ефимочкина. – Москва, 2010. – 40 с.
56. Єріна А. М. Статистичне моделювання та прогнозування: навчальний посібник / А. М. Єріна. – Київ : КНЕУ, 2001. – 170 с.

57. Жиряева Е. Применение стандартов Codex Alimentarius в Российской Федерации / Е. Жиряева, Т. Хайландт // Пищевая промышленность. – 2007. – № 1. – С. 58–62.
58. Засекін Д. А. Санітарно-гігієнічна роль води / Д. А. Засекін // Аграрна наука і освіта. – 2004. – № 3–4. – С. 59–63.
59. Засекін Д. А. Санітарні норми для тваринницьких та переробних підприємств України : навч.-норм. посібник / Д. А. Засекін, В. М. Поляковський. – Київ : ТОВ «НВП «Інтерсервіс»», 2011. – 216 с.
60. Злобин С. С. Нейронные сети / С. С. Злобин. – Санкт-Петербург: Прометей, 2002. – 229с.
61. Использование оценок микробиологического риска в управлении рисками: Информационная записка ИНФОСАН № 05/2007 (Оценки микробиологического риска). – ФАО/ВОЗ, 2007. – 5 с.
62. Іванова Л. С. Стан та розвиток ринку молока і молокопродуктів після вступу України до СОТ [Електронний ресурс] / Л. С. Іванова // Електронне наукове фахове видання «Ефективна економіка». – 2001. – Режим доступу : <http://www.economy.nauka.com.ua>.
63. Індеси промислової продукції [Електронний ресурс] : за даними Державного комітету статистики України. – Режим доступу : <http://ukrstat.gov.ua>.
64. Інструкція про порядок здійснення державного нагляду за додержанням стандартів, норм і правил №321 від 03.06.2002, затверджена Наказом Держстандарту України та зареєстрована в Міністерстві юстиції України 18.06.2002 за № 512/6800. – 2002. – 12 с.
65. Как приготовить сухую молочную смесь для кормления ребенка [Електронний ресурс] / Департамент ВОЗ по безопасности пищевых продуктов, зоонозам и болезням пищевого происхождения в сотрудничестве с Продовольственной и сельскохозяйственной организацией ООН (ФАО). – Всемирная организация здравоохранения, 2007. – 24 с. – Режим доступа : www.who.int/foodsafety.
66. Касянчук В. В. Удосконалення ветеринарно-санітарного контролю виробництва молока на фермі – основний важіль у забезпеченні населення високоякісною продукцією / В. В. Касянчук, Я. Й. Крижанівський, І. П. Даниленко [та ін.] // Матеріали I Міжнар. наук.-практ. конф «Екотрофологія». – 2005. – С. 105–108.
67. Касянчук В. В. Сучасні методологічні підходи щодо оцінки мікробіологічного ризику в харчових продуктах / В. В. Касянчук, О. М. Бергілевич // Вісник Сумського НАУ. Серія «Тваринництво». – 2006. – Вип. № 10 (11). – С. 49–52.

68. Касянчук В. В. Проблеми безпеки української молочної продукції / В. В. Касянчук // Продукты и ингредиенты. – 2008. – № 5 (47). – С. 54–56.
69. Касянчук В. В. Организация ветеринарно-санитарного контроля на молочных фермах в Украине на соответствие принципам системы НАССР / В.В. Касянчук, А.Н.Бергилевич, М.П. Остапюк, Н.Д. Кухтин // Материалы Международной научно-практической конференции молодых учёных, посвящённой 170-летию УО БГСХА. Горки, 2009. – Ч. 1. – С. 333–339.
70. Касянчук В. В. Забезпечення сталого виробництва сирого молока на фермах за використання загальних та специфічних екологічних критеріїв при здійсненні ветеринарно-санітарного контролю / В. В. Касянчук, О. М. Бергілевич, А. М. Марченко, М. В. Козловська // Вісник Сумського національного аграрного університету. Серія «Ветеринарна медицина». – 2013. – Вип. 2 (32). – С. 57–62.
71. Касянчук В. В. Роль ветеринарно-санітарного контролю мікробіологічних ризиків при виробництві молока на фермі / В. В. Касянчук, О. М. Бергілевич, М. Д. Кухтін [та ін.] // Аграрний вісник Причорномор'я: збірник наукових праць Одеського державного аграрного ун-ту. Серія «Ветеринарні науки». – Одеса, 2011. – Вип. 59. С. 55–60.
72. Касянчук В. В. Нові патогенні мікроорганізми, що актуальні для контролю в молоці та молочних продуктів (частина 1) / В. В. Касянчук, О. М. Бергілевич, О. Терьохіна, Є. А. Гришина // Молочна індустрія. – 2015. – № 3. – С. 30–33.
73. Касянчук В. В. Нові патогенні мікроорганізми, що актуальні для контролю в молоці та молочних продуктів (частина 2) / В. В. Касянчук, О. М. Бергілевич, О. Терьохіна, Є. А. Гришина // Молочна індустрія. – 2015. – № 4. – С. 34–37.
74. Касянчук В. В. Контроль відповідності мікробіологічним критеріям у виробництві молокопродуктів / В. В. Касянчук, О. М. Бергілевич, Є. Гришина, О. Терьохіна // Молочна індустрія. – 2016. – № 2. – С. 32–35.
75. Касянчук В. В. Контроль відповідності мікробіологічним критеріям у виробництві молокопродуктів / В. В. Касянчук, О. М. Бергілевич, Є. Гришина, О. Терьохіна // Молочна індустрія. – 2016. – № 3. – С. 18–21.
76. Козак О. А. Про якість молока в сільськогосподарських підприємствах / О. А. Козак // Економіка АПК. – 2005. – № 7. – С. 48–50.
77. Компьютерное моделирование биотехнологических процессов и систем : учеб. пособие / Д. С. Дворецкий, С. И. Дворецкий, Е. И. Муратова, А. А. Ермаков. – Тамбов : Изд-во ТГТУ, 2005. – 80 с.

78. Костюк О. Д. Якість молочної продукції, як конкурентна перевага на ринку / О. Д. Костюк // Науковий вісник НУБіП України. – 2010. – Вип. 154, ч. 1. – С. 58–62. – Режим доступу : http://www.nbu.gov.ua/portal/chem_biol/nvnau/2010_154_1/10kod.pdf.

79. Куваева И. Б. Создание сухих питательных сред для микробиологического контроля качества пищевых продуктов / И. Б. Куваева, С. А. Шевелева, Н. Р. Карликанова // Науч.-практ. конференция «Прогрессивные, экологически безопасные технологии хранения и комплексной переработки сельхозпродукции». – 1998. – С. 193–194.

80. Куваева И. Б. Особенности санитарно-микробиологической экспертизы продуктов детского питания / И. Б. Куваева, С. А. Шевелева, Н. Р. Ефимочкина // Мат. I Всерос. конгресса с межд. участием «Питание детей: XXI век». – 2000. – С. 123.

81. Кузьминський С. М. Проблемні питання мікробіологічного контролю харчових продуктів / С. М. Кузьминський // Проблеми харчування. – 2006. – № 1. – С. 36–41.

82. Кузнецова Ж. Ю. Исследование психотрофной микрофлоры молока и влияние на качество молочных продуктов / Ж. Ю. Кузнецова, Л. А. Бусилова, М. В. Щемелева // Екотрофология. Сучасні проблеми. – БДАУ, 2005. – С. 16–17.

83. Кухтин М. Д. Ветеринарно-санітарна оцінка молока коров'ячого незбираного за вмістом золотистого стафілококу : дис. ... канд. вет. наук : 16.00.09 / Кухтін Микола Дмитрович. – Львів, 2004. – 132 с.

84. Кухтін М. Д. Динаміка мікробіологічного процесу мікрофлори молока / М. Д. Кухтін // Наук. вісник Львів. нац. академії вет. медицини ім. С. З. Гжицького. – 2006. – Т. 8, № 2 (29), ч.1. – С. 112–116.

85. Кухтин М. Д. Одержання якісного і безпечного молока / М. Д. Кухтин // Тваринництво України. – 2007. – № 7. – С. 7–8.

86. Магерова Т. М. Прогнозирование заболеваемости крупного рогатого скота некробактериозом с использованием искусственных нейронных сетей на основе выявления абсцессов в печени / Т. М. Магерова, А. А. Самоловов // Сибирский вестник с.-х. науки. – 2005. – № 2. – С. 20–23.

87. Мазур Т. Г. Видовий склад мікрофлори сирого збірного молока / Т. Г. Мазур, Т. М. Димань // Матер. VII Міжнар. наук.-практ. конф. «Наука і освіта – 2004». – 2004. – Т. 69. – С.10–11.

88. Мазур Т. Г. Критичні точки на шляху отримання екологічно чистого молока / Т. Г. Мазур, Т. М. Димань // Матер. III Міжнар. наук.-практ. конф. «Динаміка наукових досліджень – 2004». – 2004. – Т. 33. – С.12–13.

89. Мазур Т. Г. Екологія сирого молока у господарствах різних форм власності / Т. Г. Мазур, Т. М. Димань // Збірник наукових праць Луганського національного аграрного університету. Серія «Ветеринарні науки». – 2005. – Вип. 50/73. – С. 124–128.

90. Мазур Т. Г. Вплив санітарно-гігієнічного стану сирого молока на якісний та кількісний склад залишкової мікрофлори пастеризованого молока / Т. Г. Мазур, Т. М. Димань // Наук. вісник Львівської національної академії ветеринарної медицини ім. С. З. Гжицького. – 2005. – Т. 7, № 4 (27), ч. 1. – С. 102–108.

91. Мазур Т. Г. Мікробіологічні ризики на шляху отримання питного молока та підходи до їх усунення : дис. ... канд. вет. Наук : 16.00.06 / Мазур Тетяна Григорівна. – Біла Церква, 2007. – 137 с.

92. Медико-биологические требования и санитарные нормы качества продовольственного сырья и пищевых продуктов : МБП № 5061-89 от 01.08.1989. – Министерство здравоохранения СССР. – Москва, 1989. – 24 с.

93. Мельник М. А. Сучасні підходи до гігієни при виробництві харчових продуктів / М. А. Мельник // Матеріали V Міжнародного конгресу спеціалістів ветеринарної медицини. – 2007. – С. 163–166.

94. Метод определения бактерий *Enterobacter sakazakii* в продуктах для питания детей раннего возраста : МУК 4.2.2428-08, утвр. Главным государственным санитарным врачом РФ 29 октября 2008 года. – 2008. – 21 с.

95. Методи виділення та підрахунку кількості бактерій *Enterobacter* (*Cronobacter*) *sakazakii* / О. М. Бергілевич, В. В. Касянчук, Т. О. Гаркавенко [та ін.] // Методичні рекомендації. – 2010. – 38 с.

96. Методичні рекомендації щодо впровадження системи НАССР на молокопереробних підприємствах / О. М. Якубчак, Т. М. Димань, Л. В. Олійник, Т. Г. Мазур. – Київ : Біопром, 2005. – 40 с.

97. Методичні рекомендації щодо встановлення відповідності мікробіологічним критеріям харчових продуктів та санітарно-гігієнічних умов виробничого процесу / В. В. Касянчук, О. М. Бергілевич, Д. А. Засекін [та ін.] // Затверджені вченою радою ДНДІ ЛДВСЕ (протокол № 3 від 20 квітня 2011 р). – 25 с.

98. Мікробіологічні критерії для харчових продуктів / В. В. Касянчук, О. М. Бергілевич, М. П. Остапук [та ін.] // Ветеринарна медицина України. – 2010. – № 6. – С. 36–40.

99. Мікробіологія харчових продуктів та кормів для тварин. Готування досліджуваних проб, вихідної суспензії та десятикратних розведень для мікробіологічного дослідження. Частина 1. Загальні правила готування вихідної суспензії та десятикратних розведень (ISO 6887-1:1999, IDT): ДСТУ

ISO 6887-1:2003. – [Чинний від 2004-01-10]. – Київ : Держспоживстандарт України, 2004. – IV, 10 с. – (Національні стандарти України).

100. Молоко. Методы определения белка: ГОСТ 25179:1990. – [Действующий от 1991-01-07]. – Москва: Госстандарт СССР, 1991. – 6 с. – (Межгосударственный стандарт).

101. Молоко и молочные продукты. Методы микробиологического анали за : ГОСТ 9225:1984. – [Действующий от 1986-01-01]. – Москва : Госстандарт СССР, 1986. – 15 с. – (Межгосударственный стандарт).

102. Молоко и молочные продукты. Методы определения жира : ГОСТ 5867:1990. – [Действующий от 1991-01-07]. – Москва : Госстандарт СССР, 1991. – 13 с. – (Межгосударственный стандарт).

103. Молоко и молочные продукты. Титриметрические методы определения кислотности : ГОСТ 3624:1992. – [Действующий от 1994-01-01]. – Москва : Госстандарт СССР, 1994. – 9 с. – (Межгосударственный стандарт).

104. Молоко і молочні продукти. Визначення кількості мікроорганізмів. Метод підрахування колоній за температури 30 °С (IDF 100В:1991, IDT) : ДСТУ IDF 100В-2003. – [Чинний від 2005-01-01]. – Київ : Держспоживстандарт України, 2005. – IV, 6 с. – (Національні стандарти України).

105. Молоко і молочні продукти. Готування проб і розведень для мікробіологічного досліджування (IDF 122С:1996, IDT) : ДСТУ IDF 122С:2003. – [Чинний від 2004-01-10]. – Київ : Держспоживстандарт України, 2005. – IV, 8 с. – (Національні стандарти України).

106. Молоко коров'яче незбиране. Вимоги при закупівлі : ДСТУ 3662-97. – [Чинний від 1998-01-01]. – Київ : Держспоживстандарт України, 1998. – IV, 9 с. – (Національні стандарти України).

107. Молоко та молочні продукти. Настанови з відбирання проб (ISO 707:1997, IDT) : ДСТУ ISO 707:2002. – [Чинний від 2003-01-10]. – Київ : Держспоживстандарт України, 2003. – IV, 32 с. – (Національні стандарти України).

108. Молоко та молочні продукти. Відбирання проб. Контроль за якісними ознаками (ISO 5538:1987, IDT) : ДСТУ ISO 5538:2004. – [Чинний від 2006-01-04]. – Київ : Держспоживстандарт України, 2006. – IV, 23 с. – (Національні стандарти України).

109. Моніторинг розвитку молока та молочних продуктів України [Електронний ресурс] : за даними спілки молочних підприємств України. – Київ, 2009. – 110 с. – Режим доступу : <http://www.molprom.com.ua>.

110. Морозова Е. Н. Гармонизация критериев и методов оценки качества и безопасности продуктов животного происхождения : дис. ... канд. биол. наук : 16.00.06 / Морозова Елена Николаевна. – Москва, 2005. – 195 с.

111. Обнаружение *Enterobacter sakazakii* в детских сухих молочных продуктах / Н. Р. Ефимочкина, И. Б. Быкова, Н. В. Барбер [и др.] // Вопросы детской диетологии. – 2005. – Т. 3, № 4. – С. 46–49.

112. Обов'язковий мінімальний перелік досліджень сировини, продукції тваринного та рослинного походження, комбікормової сировини, комбікормів, вітамінних препаратів та ін., які необхідно проводити в державних лабораторіях ветеринарної медицини і за результатами яких видається ветеринарне свідоцтво (ф-2), затверджений Наказом Державного департаменту ветеринарної медицини України №16 від 03.11.98 р. та зареєстрований в Міністерстві юстиції України 30.11.98 р. за №761/3201 [Електронний ресурс]. – 1998. – 40 с. – Режим доступу : <http://zakon1.rada.gov.ua/cgi-bin/laws>.

113. О внесении изменений в Федеральный закон «Технический регламент на молоко и молочную продукцию» Федеральный закон РФ № 163 ФЗ от 22 июля 2010 г. – Опубликовано в Российской газете 26 июля 2010 г. – 2010. – С. 5.

114. Об утверждении ветеринарно-санитарных правил для молочно-товарных ферм организаций, осуществляющих деятельность по производству молока : Постановление Министерства сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь от 17 марта 2005 г. – 2005. – № 16. – 29 с.

115. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам : МУК 4.2.1890-04, утвер. Главным государственным санитарным врачом РФ 4 марта 2004 года. – 2004. – 15с.

116. Определитель бактерий Берджи / под. ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита [и др.]. – Москва : Мир, 1997. – Т. 2. – 250 с.

117. Організація ветеринарно-санітарного контролю виробництва молока коров'ячого на фермі відповідно до вимог СОТ / В. В. Касянчук, О. М. Бергілевич, Я. Й. Крижанівський [та ін.] // Ветеринарна медицина України. – 2006. – № 7. – С. 38–40.

118. Організація ветеринарно-санітарного контролю якості та безпеки молока коров'ячого на молочних фермах у відповідності системи НАССР / В. В. Касянчук, О. М. Бергілевич, Я. Й. Крижанівський [та ін.] // Збірник наукових праць Луганського НАУ. Серія «Технічні науки». – 2006. – № 65 (88). – С. 96–100.

119. Осташко Т. О. Загальні переваги і ризики від членства у СОТ: досвід інших країн / Т. О. Осташко // Ефективні корми та годівля. – 2006. – № 8. – С. 11–14.

120. Оцінка мікробіологічних ризиків [Електронний ресурс] : за даними ФАО/ВОЗ. – Режим доступу : http://www.fao.org/ag/agn/agns/-jemra_riskassessment_en.asp.

121. Оценка риска здоровью населения при воздействии факторов микробной природы, содержащихся в пищевых продуктах: методические основы, принципы и критерии оценки / МР 2.1.10.0067-12.

122. Очирова Л. А. Микробиологическая оценка безопасности пищевых продуктов : автореф. дис. ... канд. ветер. наук : 16.00.03 / Л. А. Очирова. – Барнаул, 2008. – 20 с.

123. Пащенко О. П. Нормативно-правове забезпечення стратегічного розвитку та функціонування підприємств харчової промисловості в Україні / О. П. Пащенко // Вісник ЖДТУ. – 2010. – № 4 (54). – С. 265–272.

124. Пизенгольц В. М. Становление качества и безопасности молочной промышленности в России / В. М. Пизенгольц // Экономика сельскохозяйственных и перерабатывающих предприятий. – 2009. – № 4. – С. 44–47.

125. Питання Національної комісії України з Кодексу аліментаріус: Постанова Кабінету Міністрів України № 903 від 3 липня 2006 р. [Електронний ресурс]. – 2006. – 15 с. – Режим доступу : <http://news.yurist-online.com>.

126. Правила ветеринарно-санітарної експертизи молока і молочних продуктів та вимог щодо їх реалізації : зареєстровані в Міністерстві юстиції України 7 травня 2004 р. за № 579/9178 [Електронний ресурс]. – 2004. – 29 с. – Режим доступу : <http://document.org.ua/pravila-veterinarno-sanitarnoyi-ekspertizi-moloka-i-molochni-nor8341.html>.

127. Применение сухих питательных сред для микробиологического контроля продуктов детского питания / Н. Р. Ефимочкина, С. А. Шевелева, В. Ф. Семенихина [и др.] // Мат. I Всерос. конгресса с межд. участием «Питание детей: XXI век». – 2000. – С. 174–175.

128. Принципы и руководящие указания по включению оценки микробиологического риска в разработку стандартов, руководящих указаний и сопутствующих документов в области безопасности пищевых продуктов : доклад о результатах совместных консультаций ФАО/ВОЗ. [Электронный ресурс]. – ФАО/ВОЗ, 2002 г. – 28 с. – Режим доступа : <http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/march2000/en>.

129. Принципы и руководящие указания по проведению оценки микробиологических рисков: САС/GL-30 [Электронный ресурс]. – Комиссия по Кодексу алиментаріус, 1999. – 15 с. – Режим доступа : <http://www.codexalimentarius.net/download/standards/357/CXG030e.pdf>.

130. Програма інтеграції України до Європейського Союзу / Програму схвалено Указом Президента № 1072/2000 (1072/2000) від 14.09.2000 [Електронний ресурс]. – 2000. – 6 с. – Режим доступу : <http://zakon.rada.gov.ua>

131. Про безпечність та якість харчових продуктів : Закон України, введено в дію Постановою ВР № 771/97-ВР від 23 лютого 1997 р. [Електронний ресурс] // Відомості Верховної Ради України. – Офіц. вид. – 1998. – № 19. – С. 98–100. – Режим доступу : <http://zakon1.rada.gov.ua>.

132. Про ветеринарну медицину : Закон України, введено в дію Постановою ВР № 2499-ХІІ від 25.06.92 [Електронний ресурс] // Відомості Верховної Ради України. – Офіц. вид. – 1992. – № 36. – С. 532–539. – Режим доступу : <http://zakon1.rada.gov.ua>

133. Про внесення змін до Закону України «Про молоко та молочні продукти» : Закон України, введено в дію Постановою ВР № 2132-VI від 15 квітня 2010 р. [Електронний ресурс] // Відомості Верховної Ради України. – Офіц. вид. – 2010. – № 21. – С. 221. – Режим доступу : <http://zakon1.rada.gov.ua>.

134. Про вступ України до Світової організації торгівлі : Закон України, введено в дію Постановою ВР № 250-VI від 10.04.2008 [Електронний ресурс] // Відомості Верховної Ради України. – Офіц. вид. – 2008. – № 2. – Ст. 33. – Режим доступу : <http://search.ligazakon.ua>.

135. Про державне регулювання імпорту сільськогосподарської продукції : Закон України, введено в дію Постановою ВР № 468/97-ВР від 17 липня 1997 р. [Електронний ресурс] // Відомості Верховної Ради України. – Офіц. вид. – 1997. – № 44. – С. 281–287. – Режим доступу : <http://zakon1.rada.gov.ua>.

136. Про державний ветеринарно-санітарний нагляд та контроль за діяльністю суб'єктів господарювання щодо забою тварин, переробки, зберігання, транспортування й реалізації продукції тваринного походження : положення [Електронний ресурс] / Затв. Наказом Головного державного інспектора ветеринарної медицини України № 45 від 01.09.2000. Зареєстр. в Мінюсті України 31.10.2000 р. за № 760/4981, із змінами, внесеними згідно з Наказом Мінагрополітики № 51 від 23.06.2003 р. – 2003. – Режим доступу : <http://document.org.ua/>.

137. Про державний нагляд за дотриманням стандартів, норм і правил і відповідальність за їх порушення : Декрет Кабінету Міністрів України № 30-93 від 08.04.93 р. // Відомості Верховної Ради України. – 1993. – № 23. – С. 247. – Режим доступу : <http://zakon1.rada.gov.ua>.

138. Про забезпечення санітарного та епідемічного благополуччя населення : Закон України введено в дію Постановою ВР № 4005-ХІІ від 24.02.94 [Електронний ресурс] // Відомості Верховної Ради України. – Офіц. вид. – 1994. – № 27. – С. 218–219. – Режим доступу : <http://zakon1.rada.gov.ua>.

139. Про Загальнодержавну програму адаптації законодавства України до законодавства Європейського Союзу : Закон України введено в дію

Постановою ВР № 852-VI від 14 січня 2009 р. [Електронний ресурс] // Відомості Верховної Ради України. – Офіц. вид. – 2004. – № 29. – С. 367. – Режим доступу : <http://search.ligazakon.ua>.

140. Про загальну безпеку продукції : проект Закону України № 3421 від 28.11.2008 р. [Електронний ресурс]. – 2008. – 5 с. – Режим доступу : <http://search.ligazakon.ua>.

141. Про затвердження критеріїв, за якими оцінюється ступінь ризику від провадження господарської діяльності, пов'язаної з виробництвом, випуском і реалізацією продукції (виконанням робіт, наданням послуг), та визначається періодичність проведення планових заходів державного нагляду (контролю) : Постанова Кабінету Міністрів України № 1164 від 27.12.2008 [Електронний ресурс]. – 2008. – 15 с. – Режим доступу : <http://news.yurist-online.com>.

142. Про затвердження критеріїв оцінки ступеня ризику від провадження господарської діяльності, яка підлягає державному ветеринарно-санітарному контролю та нагляду: Постанова Кабінету Міністрів України № 848 від 24.09.2008 [Електронний ресурс]. – 2008. – 25 с. – Режим доступу : <http://news.yurist-online.com>.

143. Про затвердження Технічного регламенту «Вимоги щодо виробництва молока та молочних продуктів» : проект Постанови Кабінету Міністрів України від 15.03.2010 [Електронний ресурс]. – 2010. – 10 с. – Режим доступу : <http://www.minagro.kiev.ua>.

144. Про захист прав споживачів : Закон України введено в дію Постановою ВР № 1023-XII від 12 травня 1991 р. [Електронний ресурс] / Відомості Верховної Ради України. – Офіц. вид. – 1991. – № 30. – С. 380–387. – Режим доступу : <http://zakon1.rada.gov.ua>.

145. Про мінімальні специфікації якості основних продуктів тваринного походження: проект Постанови Кабінету Міністрів України від 02.09.2009 [Електронний ресурс]. – 2009. – 6 с. – Режим доступу : <http://www.minagro.kiev.ua>.

146. Про молоко і молочні продукти : Закон України введено в дію Постановою ВР № 1870-IV від 24 червня 2004 р. [Електронний ресурс] // Відомості Верховної Ради України. – Офіц. вид. – 2004. – № 47. – С. 513. – Режим доступу : <http://zakon1.rada.gov.ua>.

147. Про оптимізацію системи центральних органів виконавчої влади : Указ Президента України № 1085/2010 від 9 грудня 2010 року [Електронний ресурс]. – 2010. – 5 с. – Режим доступу : <http://www.dmsu.gov.ua>.

148. Про основні засади державного нагляду(контролю) у сфері господарської діяльності : Закон України, введено в дію Постановою ВР № 877-

V від 05.04.2007 року [Електронний ресурс] // Відомості Верховної Ради України. – Офіц. вид. – 2007. – № 29. – С. 389. – Режим доступу : <http://search.ligazakon.ua>.

149. Про підтвердження відповідності : Закон України №2406-111 від 17.05.2001 із змінами, внесеними згідно із Законами «Про внесення змін до деяких законів України» № 211 в-У II від 21.10.2004 [Електронний ресурс] // Відомості Верховної Ради України. – Офіц. вид. – 2005. – № 2. – Ст. 33. – Режим доступу : <http://search.ligazakon.ua>.

150. Про стандарти, технічні регламенти та процедури оцінки відповідності : Закон України, введено в дію Постановою ВР № 3164-IV від 01.12.2005 [Електронний ресурс] // Відомості Верховної Ради України. – Офіц. вид. – 2006. – № 12. – С. 101–106. – Режим доступу : <http://search.ligazakon.ua>.

151. Про створення Національної комісії України зі зводу харчових продуктів Кодексу Аліментаріус : Постанова Кабінету Міністрів України № 169 від 16 лютого 1998 р. [Електронний ресурс]. – 1998. – 5 с. – Режим доступу : <http://news.yurist-online.com>.

152. Процюк Н. І. Проблеми якості молока в особистих селянських господарствах населення / Н. І. Процюк // Наук. вісн. НАУ. – 2007. – Вип. 110. – С. 294–297.

153. Радионенко В. Н. Прогнозирование сроков хранения растительного сырья в модулях с модифицированной атмосферой / В. Н. Радионенко // Восточно-Европейский журнал передовых технологий. – 2010. – № 2/7(44). – С. 48–51.

154. Разработка практических стратегий управления рисками на основе результатов оценки микробиологического риска : Доклад Совместной консультативной группы ФАО/ВОЗ [Электронный ресурс]. – ФАО/ВОЗ, 2006. – 35с. – Режим доступа : <http://www.who.int/foodsafety/micro/jemra/meetings/2005/en>.

155. Рудакова О. Б. Современные методы контроля качества молочной продукции / О. Б. Рудакова, А. В. Рудакова, К. К. Полянский // Переработка молока. – 2009. – № 9. – С. 56–57.

156. Руденко О. Г. Штучні нейронні мережі : [навчальний посібник для студентів вищих навчальних закладів] / О. Г. Руденко, Є. В. Бодянський. – Харків : Компанія СМІТ, 2006. – 404 с.

157. Санитарные правила по уходу за доильными установками и молочной посудой, контролю их санитарного состояния и санитарного качества молока, утвержденные заместителем Министра сельского хозяйства СССР 26.06.85 [Электронный ресурс]. – 1985. – 50 с. – Режим доступа : http://www.mcsp.ru/base_gvc/vetzac/document/45.html.

158. Санітарні правила щодо догляду за доїльним устаткуванням та молочним інвентарем і контролю їх санітарного стану / Я. Й. Крижанівський, І. П. Даниленко, Н. Ф. Моткалюк [та ін.] // Методичні рекомендації, затверджені Науково-методичною радою Державного комітету ветеринарної медицини України (протокол № 1 від 23 грудня 2010 р.). – 2010. – 12 с.

159. Сиволодский Е. П. Систематика и идентификация энтеробактерий / Е. П. Сиволодский. – Издание второе, переработанное и дополненное. – Санкт-Петербург, 2008. – 44 с.

160. Симонов Ю. Нормативы и качество пищевой продукции / Ю. Симонов // Стандарты и качество. – 2009. – № 3. – С. 40–42.

161. Система державного регулювання безпечності харчових продуктів в Україні: на шляху вдосконалення. Аналітичний звіт конференції ІФС «Реформа системи харчової безпеки: міжнародний досвід та рекомендації для України» [Електронний ресурс]. – Київ, 18 травня 2009 року. – 70 с. – Режим доступу : ifc.org/ukraine/bee.

162. Системи менеджменту якості. Вимоги (ISO 9001:2008) : ДСТУ ISO 9001:2009. – [Чинний від 2009-09-01]. – Київ : Держспоживстандарт України, 2009. – 8 с. – (Національний стандарт України).

163. Системи управління безпечністю харчових продуктів. Вимоги : ДСТУ 4161-2003. – [Чинний від 2003-01-06]. – Київ : Держспоживстандарт України, 2003. – 25 с. – (Національний стандарт України).

164. Системи управління безпечністю харчових продуктів. Вимоги до будь-яких організацій харчового ланцюга (ISO 22000:2005, IDT) : ДСТУ ISO 22000:2007. – [Чинний від 2007-01-08.]. – Київ : Держспоживстандарт України, 2007. – 15 с. – (Національний стандарт України).

165. Системи управління якістю. Основні положення і словник (ISO 9000:2005) : ДСТУ ISO 9000:2007. – [Чинний від 2008-01-01]. – Київ : Держспоживстандарт України, 2008. – 12 с. – (Національний стандарт України).

166. Системи управління якістю. Настанови щодо поліпшення діяльності (ISO 9004:2000) : ДСТУ ISO 9004:2001. – [Чинний від 2001-01-10]. – Київ : Держспоживстандарт України, 2001. – 35 с. – (Національний стандарт України).

167. Сокольська Т. В. Конкурентоспроможність продукції агросфери за якісними показниками / Т. В. Сокольська // Матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції «Розвиток агробізнесу в Україні: проблеми, пріоритети, перспективи». – Житомир, 2010. – С. 213–215.

168. Спосіб прогнозування кількості бактерій *Enterobacter sakazakii* в сирому охолодженому молоці впродовж зберігання з використанням штучних нейронних мереж в залежності від його кислотності та вмісту жиру та білка в ньому : пат. України на корисну модель № 60298 / О. М. Бергілевич,

В. В. Касянчук, Д. А. Засєкін, О. М. Алексєєв, О. О. Бергілевич ; заявник Сумський НАУ. – Заявл. 04.01.2011 ; опубл. 10.04.2011, Бюл. № 11. – 5 с.

169. Стан м'ясомолочної галузі та прогноз її розвитку після вступу України до СОТ [Електронний ресурс]. – Режим доступу : [http://www.lir.lg.ua/soc/20 trud.htm](http://www.lir.lg.ua/soc/20%20trud.htm).

170. Стратегія інтеграції України до Європейського Союзу, затверджена Указом Президента України №573/2003 від 05.07.2003 р. [Електронний ресурс]. – Режим доступу : <http://zakon.rada.gov.ua>.

171. Сулима Н. В. Розвиток ринку молока та молочної продукції в Україні / Н. В. Сулима // Економіка АПК. – 2008. – № 8. – С. 140–144.

172. Теоретичне обґрунтування порядку відбору проб харчових продуктів для досліджень на відповідність мікробіологічним критеріям / В. В. Касянчук, О. М. Бергілевич, М. П. Остапюк [та ін.] // Вісник Сумського НАУ. Серія «Ветеринарна медицина». – 2009. – Вип. 6 (25). – С. 63–67.

173. Хоменко В. І. Новий стандарт України на молоко коров'яче незбиране / В. І. Хоменко, Г. Ф. Риженко, А. І. Тютюн [та ін.] // Тези доп. наук. конф. проф.-виклад. складу, наук. співробітників та аспірантів. – Київ : Науковий світ, 2000. – С. 8.

174. Хоменко В. І. До контролю якості молока і молочних продуктів / В. І. Хоменко, Г. Ф. Риженко, А. І. Тютюн [та ін.] // Тези доп. наук. конф. проф.-виклад. складу, наук. співробітників та аспірантів. – Київ : Науковий світ, 2000. – С. 10.

175. Хохлявин С. А. Менеджмент безопасности пищевых продуктов в международных стандартах / С. А. Хохлявин, С. Михеев // Хлебопекарное производство. – 2008. – № 7. – С. 46–51.

176. Храмов А. Г. Методика нейронных сетей в прогнозировании безопасности и качества пищевых продуктов / А. Г. Храмов, В. В. Садовой, В. А. Самылина // Хранение и переработ. сельхозсырья. – 2004. – № 12. – С. 47–48.

177. Храмов А. Г. Использование методики нейронных сетей в пищевой биотехнологии / А. Г. Храмов, В. В. Садовой, В. А. Самылина // Пищевая технология. – 2004. – № 5–6. – С. 105–108.

178. Шевелева С. А. Проблемы микробиологической безопасности продуктов детского питания при их гигиенической сертификации / С. А. Шевелева, И. Б. Куваева, Н. Р. Карликанова // Науч. и практ. аспекты совершенствования качества продуктов детского и геродиетического питания. – 1997. – С. 15.

179. Шевелева С. А. Анализ микробиологического риска как основа для совершенствования системы оценки безопасности и контроля пищевых

продуктов / С. А. Шевелева, Н. Р. Ефимочкина // Матер. X Всероссийского съезда гигиенистов и санитарных врачей. – 2007. – С. 10.

180. Шевелева С. А. Современные требования безопасности и подлинности молочных продуктов / С. А. Шевелева // Переработка молока. – 2009. – № 1. – С. 12–15.

181. Шевелева С. А. Анализ риска загрязнения микроорганизмами пищевых продуктов / С. А. Шевелева // Вопросы питания. – 2006. – Т. 75, № 5. – С. 56–65.

182. Шевелева С. А. Анализ микробиологического риска как основа для совершенствования системы оценки безопасности и контроля пищевых продуктов : дисертація д-ра мед. наук : 14.00.07 / Шевелева Светлана Анатольевна. – Москва, 2007. – 350 с.

183. Якубчак О. НАССР – ефективна превентивна система гарантії безпеки продуктів харчування / О. Якубчак, С. Мельничук, А. Звон // Ветеринарна медицина України. – 2003. – № 4. – С. 37–39.

184. Якубчак О. М. Аналіз ризиків при виробництві продукції тваринного походження / О. М. Якубчак, М. А. Мельник // Мясной бизнес. – 2004. – № 10. – С. 17–20.

185. Якубчак О. М. До проблем методичного та нормативно-правового забезпечення здійснення державного ветеринарно-санітарного нагляду і контролю в Україні / О. М. Якубчак // Матеріали III Міжнародного конгресу спеціалістів ветеринарної медицини. – 2005. – С. 8.

186. Якубчак О. М. Залежність складу мікрофлори сирого збірного молока від температури та тривалості його зберігання / О. М. Якубчак, Т. В. Таран // Науковий вісник НАУ. – 2005. – Вип. 89. – С. 145–149.

187. Якубчак О. М. Зміни мікрофлори сирого молока в процесі його зберігання та транспортування / О. М. Якубчак, О. М. Джміль // Молочна промисловість. – 2006. – № 2. – С. 46–47.

188. Aigbekaen B. O. Isolation of *Enterobacter sakazakii* from Powdered Foods Locally Consumed in Nigeria / B. O. Aigbekaen, C. E. Oshoma // Pakistan Journal of Nutrition. – 2010. – Vol. 9 (7). – P. 659–663.

189. Adamson D. H. *Enterobacter sakazakii* meningitis and sepsis / D. H. Adamson, J. R. Rodgers // Clin. Microbiol. Newslett. – 1981. – Vol. 3. – P. 19–20.

190. Agreement on the Application of Sanitary and Phytosanitary Measures (SPS Agreement) / World Trade Organisation. – WTO, 1994. – 16 p. – http://www.wto.org/english/docs_e/legal_e/legal_e.htm.

191. A comparative study between overlay method and selective differential media for recovery of stressed *Enterobacter sakazakii* cells in infant formula /

M. A. Al-Holy, M. Lin, H. M. Al-Qadiri [et al.] // Food Microbiology. – 2008. – Vol. 25. – P. 22–28.

192. Al-Lami A. R. Isolation and identification of *Cronobacter spp.* obtained from different food samples in Iraq / A. R. Al-Lami, S. B. Abd-Aljali, H. Y. Fadel // World Journal of Experimental Biosciences. – 2015. – Vol. 3, No. 2. – P. 69–73.

193. A Risk Profile of Dairy Products in Australia: Food Standards Australia. – New Zealand, 2006. – 9 August. – 430 p.

194. Arku B. *Enterobacter sakazakii* survives spray drying / B. Arku, N. Mullane, E. Fox [et al.] // Int. J. Dairy Technol. – 2008. – Vol. 61. – P. 102–108.

195. Arseni A. Outbreak of colonization of neonates with *Enterobacter sakazakii* / A. Arseni, E. Malamou-Ladas, C. Koutsia [et al.] // J. Hosp Infect. – 1987. – Vol. 9. – P. 43–50.

196. Bainotti A. Microbiological quality of raw milk. II. Incidence of Enterobacteriaceae, coliform bacteria and Staphylococcus aureus / A. Bainotti, M. Carrasco de Mendoza, A. Simonetta // Revista Argentina de Lactología. – 1990. – Vol. 2, № 3. – P. 15–28.

197. Baranyi J. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food / J. Baranyi, T. Roberts // Int. J. Food Microbiol. – 1994. – Vol. 23. – P. 277–294.

198. Baranyi J. Mathematics of predictive food microbiology / J. Baranyi, T. Roberts // Int. J. Food Microbiol. – 1995. – Vol. 26. – P. 199–218.

199. Bar-Oz B. *Enterobacter sakazakii* infection in the newborn / B. Bar-Oz, A. Preminger, O. Peleg [et al.] // Acta Paediatrica. – 2001. – Vol. 90. – P. 356–358.

200. Barron J. C. Dry stress and survival time of *Enterobacter sakazakii* and other *Enterobacteriaceae* in dehydrated powdered infant formula / J. C. Barron, S. J. Forsythe // Journal of Food Protection. – 2007. – Vol. 70, № 9. – P. 2111–2117.

201. Barron J. C. Genotypic and Phenotypic Analysis of *Enterobacter sakazakii* Strains from an Outbreak Resulting in Fatalities in a Neonatal Intensive Care Unit in France / J. C. Barron, E. Hurrell, S. Townsend-Loc-Carrillo [et al.] // J. of Clinical Microbiol. – 2007. – Vol. 14, № 12. – P. 3979–3985.

202. Bartolucci L. A proposed method for determining bacterial colonization in drinking-water pipe networks / L. Bartolucci, A. Pariani, F. Westall [et al.] // Water Supply. – 1996. – Vol. 14. – P. 453–471.

203. Basheer I. A. Artificial neural networks: Fundamentals, computing, design, and application / I. A. Basheer, M. Hajmeer // J. of Microbiol. Methods. – 2000. – Vol. 43. – P. 3–31.

204. Baumgartner A. Detection and frequency of *Cronobacter spp.* (*Enterobacter sakazakii*) in different categories of ready-to-eat foods other than infant formula / A. Baumgartner, M. Grand, M. Liniger, C. Iversen // International Journal of Food Microbiology. – 2009. – Vol. 136, № 2. – P. 189–192.

205. Baumgartner A. Occurrence of *Cronobacter spp* in raw milk / A. Baumgartner, I. Niederhauser // J. Verbr. und Lebensm.– 2010. – Vol. 5, № 2. – P. 253.
206. Bergilevich O. The level of contamination raw cow's milk by microorganisms of the family Enterobacteriaceae including bacteria *Enterobacter sakazakii* at farms of Ukraine / O. Bergilevich, V. Kasianchuk, A. Marchenko // Food Hygiene and Technology – 43st Lenfeld's and Hökl's Days. Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2–3 Oct., 2013. – P. 100–103.
207. Beuchat L. R. *Cronobacter sakazakii* in foods and factors affecting its survival, growth and inactivation / L.R. Beuchat, H. Kim, J. B. Gurtler [et al.] // Int. J. of Food Microbiol. – 2009. – Vol. 136, № 2. – P. 204–213.
208. Biering G. Three cases of neonatal meningitis caused by *Enterobacter sakazakii* in powdered milk / G. Biering, S. Karlsson, N. C. Clark [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 1989. – Vol. 27 – P. 2054–2056.
209. Block C. Cluster of neonatal infections in Jerusalem due to unusual biochemical variant of *Enterobacter sakazakii* / C. Block, O. Peleg, N. Minster [et al.] // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. – 2002. – Vol. 21. – P. 613–616.
210. Bowen A. B. Invasive *Enterobacter sakazakii* disease in infants / A. B. Bowen, C. R. Braden // Emerg. Infect. Dis. – 2006. – Vol. 12 – P. 1185–1189.
211. Bramley A. J. The microbiology of raw milk / A. J. Bramley, C. H. McKinnon. – London : Elsevier Science Publishers, 1990. – P. 171–190.
212. Breeuwer P. Desiccation and heat tolerance of *Enterobacter sakazakii* / P. Breeuwer, A. Lardeau, M. Peterz [et al.] // J. App. Microbiol. – 2003. – Vol. 95. – P. 967–973.
213. Brown D. Models in Biology: Mathematics, Statistics and Computing / D. Brown, P. Rothery. – England, John Wiley and Sons Ltd, West Sussex, 1993. – 688p.
214. Brown M. Microbiological Risk Assesment in food procesing / M. Brown, M. Stringer. – England, Woodhaed Publishing Limited, Cambrige, 2002. – 300 p.
215. Brul S. Modelling microorganisms in food / S. Brul, S. van Gerwen, M. Zwietering. – Boca Raton, FL, CRC Press, 2007. – 294p.
216. Buchanan R. Risk assessment and predictive microbiology / R. Buchanan, R. Whiting // J. Food Prot. – 1996. – Vol. 59. – P. 31–36.
217. Buchanan R. L. Potential application of risk assessment techniques to microbiological issues related to international trade in food and food products / R. L. Buchanan, A. M. Lammerding, I. R. Clarke [et al.] // J. Food Prot. – 1998. – Vol. 61 (8). – P. 1075–1086.

218. Buchanan R. L. Microbial risk assessment: doseresponse relations and risk characterization / R. L. Buchanan, J. L. Smith, W. Long // *Int. J. of Food Microbiol.* – 2000. – Vol. 58(3). – P. 159–172.
219. Buma R. Isolation and characterization of pathogenic bacteria, including *Escherichia coli* O157:H7, from flies collected at a dairy farm field / R. Buma, H. Sanada, T. Maeda [et al.] // *Med. Entomol. Zool.* – 1999. – Vol. 50. – P. 313–321.
220. Camper A. K. Bacteria associated with antigranulocytes activated carbon particles indrinking-water / A.K. Camper, M. W. Lechevallier, S. C. Broadaway [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1986. – Vol. 52. – P. 434–438.
221. Cawthorn D. M. Evaluation of different methods for the detection and identification of *Enterobactersakazakii* isolated from South African infant formula milks and the processing environment / D. M. Cawthorn, R. Sharon Botha, C. Witthuhn // *Int. J. of Food Microbiol.* – 2008. – Vol. 127, № 1–2. – P. 129–138.
222. Chaves-Lopez De Angelis C. Characterization of *Enterobacteriaceae* isolated from an artisanal Italian ewe'scheese (Pecorino Abruzzese) / C. Chaves-Lopez De Angelis, M. Martuscelli, M. Serio [et al.] // *J. App. Microbiol.* – 2006. – Vol. 101. – P. 353–360.
223. Chen Pei-Chun. Improvement of detection method and heat resistance study among strains of *Enterobacter sakazakii* : A thesis submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree ofmasterofscience / Pei-Chun Chen. – Washington State University, Department of Food Science, 2007. – 100 p.
224. Cheroutre-Vialette M. Application of recurrent neural network to predict bacterial growth in dynamic conditions / M. Cheroutre-Vialette, A. Lebert // *Int. J. Food Microbiol.* – 2002. – Vol. 73 (2–3). – P. 107–118.
225. Choi S. H. Gram-negative bacteria selective medium to detectpost-pasteurization contamination of market milk by using dye reduction test / S. H. Choi, J. J. Choi, S. B. Lee // *Korean J. Dairy Science.* – 1999. – Vol. 21. – P. 231–240.
226. Clark N. C. Epidemiologicaltyping of *Enterobacter sakazakii* in two neonatal noscomial outbreaks / N. C. Clark, B. C. Hill, C. M. O'Hara [et al.] // *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases.* – 1990. – Vol. 13. – P. 467–472.
227. Clementino M. M. PCR analyses of tRNA intergenic spacer, 16S-23S internal transcribed spacer, and randomlyamplified polymorphic DNA reveal inter and intraspecific relationshipsof *Enterobacter cloacae* strains / M. M. Clementino, I. De Filippis, C. R. Nascimento [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 2001. – Vol. 39 (11). – P. 3865–3870.
228. Cole M. B. Microbiological performance objectives and criteria / M. B. Cole, R. B. Tompkin, J. Sofos (ed.) // *Improving the safety of fresh meat.* – Woodhead Publishing Ltd, Cambridge, England, 2005. – 350 p.

229. Coleman M. E. Qualitative and quantitative riskassessment / M. E. Coleman, H. M. Marks // Food Control. – 1999. – Vol. 10 – P. 189–197.
230. Conte F. Isolation of *Enterobacter sakazakii* from ass' milk in Sicily: case report, safety and legal issues / F. Conte, A. Passantino // Travel Medicine and Infectious Disease. – 2008. – Vol. 6, № 4. – P. 250–252.
231. Cordier J. L. Production of powdered infant formulae and microbiological control measures / J. L. Cordier // *Enterobacter sakazakii* (emerging issues in food safety). – ASM Press, Washington, D. C., New Jersey, 2008. – P. 145–185.
232. Craven H. M. Distribution, prevalence and persistence of *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*) in the nonprocessing and processing environments of five milk powder factories / H. M. Craven, C. M. McAuley, L. L. Duffy [et al.] // J. Appl. Microbiol. – 2010. – Vol. 109 (3). – P. 1044–1052.
233. Cruz A. Characterization of *Enterobacter sakazakii* isolated from different sources / A. Cruz, E. Fernandez, E. Salinas [et al.] // General Meeting American Society for Microbiology. – New Orleans, USA, 2004. – P. 51.
234. Dancer G. I. Resistance of *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) to environmental stresses / G. I. Dancer, J.-H. Mah, M.-S. Rhee [et al.] // J. of Appl. Microbiol. – 2009. – Vol. 107, № 5. – P. 1606–1614.
235. Dancer G. I. Influences of milk components on biofilm formation of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) / G. I. Dancer, J.-H. Mah, D.-H. Kang. // Lett. Appl. Microbiol. – 2009. – Vol. 48 (6). – P. 718–725.
236. Dauga C. Taxonomy and physiology of *Enterobacter sakazakii* / C. Dauga, P. Breeuwer // American Society for Microbiology. – 2007. – 350 c.
237. Dennison S. K. Multiresistant *Enterobacter sakazakii* wound infection in an adult / S. K. Dennison, J. Morris // Infect. Med. – 2002. – Vol. 19. – P. 533–535.
238. Derzelle S. A robotic DNA purification protocol and real-time PCR for the detection of *Enterobacter sakazakii* in powdered infant formulae / S. Derzelle, F. Dilasser // BMC Microbiol. – 2006. – Vol. 6. – P. 100–112.
239. Downes F. P. Compendium of methods for the microbiological examination of foods / F. P. Downes, K. Ito. – 4 edn. – American Public Health Association, Washington, DC, USA, 2001. – 500 c.
240. Draft Principles and Guidelines for the Conduct of Microbiological Risk Management (MRM): Joint FAO/WHO Food Standards Programme (CAC/GL 63 – 2007) / Codex Committee on Food Hygiene. [Electronic resource] – Rome : FAO/WHO, 2007. – 19 p. – Access mode : <http://www.fao.org/docrep/meeting/005/x8735e/x8735e0a.htm>.

241. Drudy D. 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. – Vol. 110, № 2. – P. 127–134.
242. Drudy D. *Enterobacter sakazakii*: An emergent pathogen in powdered infant formula / D. Drudy, N. R. Quinn, P. G. Wall [et al.] // Clin. Infect. Dis. – 2006. – Vol. 42. – P. 996–1002.
243. Druggan P. Culture media for the isolation of *Cronobacter* spp / P. Druggan, C. Iversen // Int. J. Food Microbiol. – 2009. – Vol. 136, № 2. – P. 169–178.
244. Dumen E. *Cronobacter sakazakii* (*Enterobacter sakazakii*): Only An Infant Problem? / E. Dumen // Kafkas Univ. Vet. Fak. – 2010. – № 16. – P. 171–178.
245. Dykstra M. J. Biological Electron Microscopy: Theory, Techniques and Troubleshooting / M. J. Dykstra, L. E. Reuss. – New York : Kluwer Academic Press, 2003. – 534 p.
246. Edelson-Mammel S. G. Thermal inactivation of *Enterobacter sakazakii* in rehydrated infant formula / S. G. Edelson-Mammel, R. L. Buchanan // J. Food Protect. – 2004. – Vol. 67 (1). – P. 60–63.
247. Edelson-Mammel S. G. Survival of *Enterobacter sakazakii* in a dehydrated powdered infant formula / S. G. Edelson-Mammel, M. K. Porteous, R. L. Buchanan // J. Food Protect. – 2005. – Vol. 68. – P. 1900–1902.
248. Pathogen prevalence and influence of composted dairy manure application on antimicrobial resistance profiles of commensal soil bacteria / T. S. Edrington, W. E. Fox, T. R. Callaway [et al.] // Foodb. Path. Dis. – 2009. – Vol. 6. – P. 217–224.
249. El-Sharoud W. M. Surveillance and genotyping of *Enterobacter sakazakii* suggest its potential transmission from milk powder into imitation recombined soft cheese / W. M. El-Sharoud, M. Z. El-Din, D. M. Ziada [et al.] // J. Appl. Microbiol. – 2008. – Vol. 105. – P. 559–566.
250. El-Sharoud W. M. Characterization of *Cronobacter* recovered from dried milk and related products / W. M. El-Sharoud, S. O'Brien, C. Negrodo [et al.] // BMC microbiology. – 2009. – Vol. 9 (1). – P. 24.
251. Emblemvag J. Qualitative risk analysis: some problems and remedies / J. Emblemvag, I. E. Kjolstad // Management Decision. – 2006. – Vol. 44 (3). – P. 395–408.
252. *Enterobacter sakazakii* and other microorganisms in powdered infant formula: meeting report / MRA Series. – World Health Organization, 2004. – 45 p.

253. *Enterobacter sakazakii* and other microorganisms in powdered infant formula: meeting report [Electronic resource] / MRA Series 6. – World Health Organization, 2007. – 60 p. – Access mode : <http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/es.pdf>
254. *Enterobacter sakazakii* [Electronic resource] / Food Safety Authority of Ireland, 2007. – Access mode : http://www.fsai.ie/publications/factsheet/factsheet_enterobacter_sakazakii.pdf
255. *Enterobacter sakazakii*: An Emerging Pathogen in Powdered Infant Formula / N. R. Drudy, T. Mullane, P. Quinn [et al.] / Food Safety Cid, 2006. – Vol. 42. – P. 996–1002.
256. Erickson M. C. *Enterobacter sakazakii*: An Emerging Food Pathogen / M. C. Erickson, J. L. Kornacki // J. Food Prot. – 2004. – Vol. 67, № 12. – P. 850–857.
257. Neonatal sepsis with *Enterobacter sakazakii* in premature twins / B. Essers, O. Baenziger, T. A. Huisman [et al.] // Swiss Medical Weekly. – 2006. – Vol. 136 (22S). – P. 151.
258. Farber J. M. *Enterobacter sakazakii* / J. M. Farber, S. J. Forsythe // American Society for Microbiol. Press – Washington, D. C., USA, 2008. – 284 p.
259. Farmer J. J. *Enterobacter sakazakii*: a new species of “*Enterobacteriaceae*” isolated from clinical specimens / J. J. Farmer, M. A. Asbury, F. W. Hickmann [et al.] // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1980. – Vol. 30. – P. 569–584.
260. Biochemical identification of new species and biogroups of *Enterobacteriaceae* isolated from clinical specimens / J. J. Farmer, B. R. Davis, F. W. Hickman-Brenner [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 1985. – Vol. 21. – P. 46–76.
261. Farmer J. J. *Enterobacteriaceae* / J. J. Farmer, M. T. Kelly // Manual Clin. Microbiol. – 1992. – P. 360–383.
262. *Enterobacteriaceae*: introduction and identification / P. R. Murray, E. J. Barron, M. A. Pfaller [et al.] // In Manual of Clinical Microbiology. – 7th edn. – 1999. – P. 442–458.
263. Faye B. Sources of Contamination in Dairy Supply Chains and Approaches to Quality Control / B. Faye, G. Loiseau // Food Safety Management in Developing Countries Proceedings of the International Workshop, CIRAD-FAO, France, 2000. – 58 p.
264. Fiore A. *Enterobacter sakazakii*: epidemiology, clinical presentation, prevention and control / A. Fiore, M. Casale, P. Aureli // Ann. Ist. Super. Sanità. – 2008. – Vol. 44, № 3. – P. 275–280.
265. Food Safety Risk Assessment of NSW Food Safety Schemes. – NSW/FA/FI039/0903, 2009. – 216 p.

266. Forsythe S. J. *Enterobacter sakazakii* and other bacteria in powdered infantmilk formula / S. J. Forsythe // Maternal and Child Nutrition. – 2005. – Vol. 1. – P. 44–50.
267. Friedemann M. *Enterobacter sakazakii* in food and beverages (other than infantformula and milk powder) / M. Friedemann // Int. J. Food Microbiol. – 2007. – Vol. 116. – P. 1–10.
268. Fulya Tasci. Microbiological and Chemical Properties of Raw Milk / Fulya Tasci // Consumed in Burdur Journal of Animal and Veterinary Advances. – 2011. – Vol. 10, № 5. – P. 635–641.
269. Gakuya F. M. Antimicrobial resistance of bacterial organisms isolated from rats / F. M. Gakuya, M. N. Kyule, P. B. Gathura [et al.] // East. Afr. Med. J. – 2001. – Vol. 78. – P. 646–649.
270. Gallagher P. G. Cerebral infarctions due to CNS infection with *Enterobacter sakazakii*/ P. G. Gallagher, W. S. Ball // Pediatr. Radiol. – 1991. – Vol. 21. – P. 135–136.
271. Gassem M. A. Study of the microorganisms associated with fermented bread (khamir) produced from sorghum in Gizan region, Saudi Arabia / M. A. Gassem // J. Appl. Microbiol. – 1999. – Vol. 86. – P. 221–225.
272. Geeraerd A. H. Application of artificial neural networks as a non-linear modular modeling technique to describe bacterial growth in chilled foodproducts / A. H. Geeraerd, C. H. Herremans, C. Cenens [et al.] // Inter. J. Food Microbiol. – 1998. – Vol. 44. – P. 49–68.
273. Giovannini M. *Enterobacter sakazakii*: An Emerging problem in Paediatric Nutrition / M. Giovannini, E. Verduci, D. Gheslini [et al.] // J. Inter. Medical Research. – 2008. – Vol. 36. – P. 394–399.
274. Gorris L. G. Food safety objective: An integral part of food chain management / L. G. Gorris // Food Control. – 2005. – Vol. 16 (9) – P. 801–809.
275. Craven H. M. Distribution, prevalence and persistence of *Cronobacter (Enterobacter sakazakii)* in the nonprocessing and processing environments of five milk powder factories / H. M. Craven, C. M. McAuley, L. L. Duffy, N. Fegan // Appl. Microbiol. – 2010. – Vol. 109 (3). – P. 1044–1052.
276. Grimm M. Cellulose and extracellular matrix component present in *Enterobacter sakazakii* biofilms / M. Grimm, R. Stephan, C. Iversen [et al.] // J. Food Prot. – 2008. – Vol. 36, № 71. – P. 13–18.
277. Guillame-Gentil O. A simple and rapid cultural method for detection of *Enterobacter sakazakii* in environmental samples / O. Guillame-Gentil, V. Sonnard, M. Kandhai [et al.] // J. Food Prot. – 2005. – Vol. 68 (1). – P. 64–69.
278. Gurtler J. B. Performance of media for recovering stressed cells of *Enterobacter sakazakii* as determined using spiral plating and

econometric techniques / J. B. Gurtler, L. R. Beuchat // Appl. and Envir. Microbiol. – 2005. – Vol. 71. – P. 7661–7669.

279. Gurtler J. B. *Enterobacter sakazakii*: acoliform of increased concern to infant health / J. B. Gurtler, J. L. Kornacki, L. R. Beuchat // Inter. J. Food Microbiol. – 2005. – Vol. 104. – P. 1–34.

280. Gurtler J. B. Growth of *Enterobacter sakazakii* in reconstituted infant formula as affected by composition and temperature / J. B. Gurtler, L. R. Beuchat // J. Food Prot. – 2007. – Vol. 70. – P. 2095–2103.

281. Gurtler J. B. Survival of *Enterobacter sakazakii* in powdered infant formula as affected by composition, water activity, and temperature / J. B. Gurtler, L. R. Beuchat // J. Food. Prot. – 2007. – Vol. 70. – P. 1579–1586.

282. Haas C. Quantitative microbial risk assessment / C. Haas, J. Rose, C. Gerba. – Hoboken, New Jersey : Wiley Publishers, 1999. – 464 p.

283. Hamilton J. V. Isolation of *Enterobacter sakazakii* from Midgut of *Stomoxys calcitrans* / J. V. Hamilton, M. J. Lehane, H. R. Braig // Emerging Infectious Diseases. – 2003. – Vol. 9, № 10. – P. 1355–1356.

284. Handbook on Import Risk Analysis for Animals and Animal Products / M. Noel and various co-authors // World Organisation for Animal Health. – Paris, France, 2004. – Vol. 1. Introduction and Qualitative Risk Analysis. – 59 p.

285. Handbook on Import Risk Analysis for Animals and Animal Products / M. Noel and various co-authors // World Organisation for Animal Health. – Paris, France, 2004. – Vol. 2. Quantitative Risk Assessment. – 124 p.

286. Hawkins R. E. *Enterobacter sakazakii* bacteremia in an adult / R. E. Hawkins, C. R. Lissner, J. P. Sanford // South. Med. J. – 1991. – Vol. 84. – P. 93–95.

287. Hajmeer M. N. The growth of *Escherichia coli* O157:H7 – a back propagation neural network approach / M. N. Hajmeer, I. A. Basheer, Y. M. Najjar // Intelligent Engineering Systems Through Artificial Neural Networks. – ASME Press, New York, 1996. – Vol. 6. – P. 635–640.

288. Hajmeer M. N. Computational neural networks for predictive microbiology: II. Application / M. N. Hajmeer, I. A. Basheer, Y. M. Najjar // Inter. J. Food Microbiol. – 1997. – Vol. 34. – P. 51–66.

289. Hajmeer M. N. A nonlinear response surface model based on artificial neural networks for growth of *Saccharomyces cerevisiae* / M. N. Hajmeer, I. A. Basheer, D. Y. Fung [et al.] // J. Rapid Methods and Automation in Microbiol. – 1998. – Vol. 6. – P. 103–118.

290. Hajmeer M. N. New approach for modeling generalized microbial growth curves using artificial neural networks / M. N. Hajmeer, I. A. Basheer,

J. L. Marsden [et al.] // J. Rapid Methods and Automation in Microbiol. – 2000. – Vol. 8, № 4. – P. 265–284.

291. Hajmeer M. N. Comparison of logistic regression and neural network-based classifiers for bacterial growth / M. N. Hajmeer, I. A. Basheer // Food Microbiol. – 2003. – Vol. 20. – P. 43–55.

292. Health Professionals Letter on *Enterobacter sakazakii* Infections Associated With Use of Powdered (Dry) Infant Formulas in Neonatal Intensive Care Units U. S. [Electronic resource] / Food and Drug Administration, 2002. – Access mode : <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/inf-ltr3.html>.

293. Healy B. *Cronobacter (Enterobacter sakazakii)*: an opportunistic foodborne pathogen / B. Healy, S. Cooney, S. O'Brien [et al.] // Foodborne Pathog Dis. – 2010. – Vol. 7 (4). – P. 339–350.

294. Hein I. Temporal and Spatial Distribution of *Cronobacter* Isolates in a Milk Powder Processing Plant Determined by Pulsed-Field Gel Electrophoresis / I. Hein, B. Gadzov, D. Schoder [et al.] // Foodborne Pathogens and Disease. – 2009. – Vol. 6 (2). – P. 225–233.

295. Herv's C. Optimization of computational neural network for its application to the prediction of microbial growth in foods / C. Herv's, G. Zurera, R. Garcia [et al.] // Food Science and Technology International. – 2001. – Vol. 7. – P. 159–163.

296. Heuvelink A. E. *Enterobacter sakazakii* in melkpoeder / A. E. Heuvelink, F. D. Kodde, J. T. Zwartkruis-Nahuis [et al.] // Keuringsdienst van Waren Oost, 2001. – Project Number OT0110.

297. Heuvelink A. E. Handhavingsactie *Enterobacter sakazakii* in poedervormige producten. Voedsel en Waren Autoriteit / A. E. Heuvelink, H. Moes, J. J. Tilburg [et al.] // Keuringsdienst van Waren Oost, 2004. – Project number OT03H006.

298. Himelright L. *Enterobacter sakazakii* infections associated with the use of powdered infant formula / L. Himelright, E. Harris, V. Lorcg [et al.] // Tennessee, JAMA, 2002. – Vol. 287. – P. 2204–2205.

299. Hoornstra E. Quantitative microbiological risk assessment / E. Hoornstra, S. Notermans // Int. J. Food Microbiol. – 2001. – Vol. 66 (1–2). – P. 21–29.

300. Isolation and enumeration of *Enterobacter sakazakii* from dehydrated powdered infant formula / US Food and Drug Administration Center for Food Safety and Applied Nutrition. – 2002. – 5 p. – Available from : <http://www.cfsan.fda.gov/~comm/mmesakaz.html>.

301. Iversen C. Risk profile of *Enterobacter sakazakii*, an emergent pathogen associated with infant milk formula / C. Iversen, S. J. Forsythe // Trends in Food Science and Technology. – 2003. – Vol. 14. – P. 443–454.
302. Iversen C. Isolation of *Enterobacter sakazakii* and other *Enterobacteriaceae* from powdered infant formula milk and related products / C. Iversen, S. Forsythe // Food Microbiology. – 2004. – Vol. 21. – P. 771–777.
303. Iversen C. Identification and phylogeny of *Enterobacter sakazakii* relative to *Enterobacter* and *Citrobacter species* / C. Iversen, M. Waddington, L. W. On [et al.] // J. Clinical Microbiol. – 2004. – Vol. 42. – P. 5368–5370.
304. Iversen C. A selective differential medium for *Enterobacter sakazakii*, a preliminary study / C. Iversen, P. Druggan, S. Forsyth // Inter. J. Food Microbiol. – 2004. – Vol. 96, № 2. – P. 133–139.
305. Iversen C. The growth profile, thermotolerance and biofilm formation of *Enterobacter sakazakii* grown in infant formula milk / C. Iversen, M. Lane, S. J. Forsythe // Letters in Applied Microbiol. – 2004. – Vol. 38. – P. 378–382.
306. Iversen C. The biochemical differentiation of *Enterobacter sakazakii* genotypes / C. Iversen, M. Waddington, J. Farmer [et al.] // BMC microbiology. – 2006. – Vol. 6. – P. 94.
307. Iversen C. The taxonomy of *Enterobacter sakazakii*: proposal of a new genus *Cronobacter* gen. nov. and description of *Cronobacter sakazakii* comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *sakazakii*, comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *Malonaticus* subsp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensi* sp. nov. and *Cronobacter* genomospecies I. / C. Iversen, A. Lehner, N. Mullane // BMC Evol Biol. – 2007. – № 7. – P. 64.
308. Iversen C. Identification of "*Cronobacter*" spp. (*Enterobacter sakazakii*) / C. Iversen, A. Lehner, N. Mullane [et al.] // J. clinical microbiol. – 2007. – Vol. 45 (11). – P. 3814–3816.
309. Iversen C. Comparison of media for the isolation of *Enterobacter sakazakii* / C. Iversen, J. S. Forsythe // Applied and environmental microbiol. – 2007. – P. 48–52.
310. Iversen C. *Cronobacter* gen. nov., a new genus to accommodate the biogroups of *Enterobacter sakazakii* / C. Iversen, N. Mullane, B. McCardell [et al.] // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2008. – Vol. 58 (6). – P. 1442–1447.
311. Iversen C. Development of a Novel Screening Method for the Isolation of "*Cronobacter*" spp. (*Enterobacter sakazakii*) / C. Iversen, P. Druggan, S. Schumacher [et al.] // Appl. Envir. Microbiol. – 2008. – Vol. 74. – P. 2550–2553.
312. Iversen C. Introductory note to the *Cronobacter* special issue / C. Iversen, S. Fanning // Int. J. of Food Microbiol. – 2009. – Vol. 136, № 2. – P. 151.

313. Isolation of *Cronobacter* spp. (formerly *Enterobacter sakazakii*) from infant food, herbs and environmental samples and the subsequent identification and confirmation of the isolates using biochemical, chromogenic assays, PCR and 16S rRNA sequencing / W. Z. Jaradat, Qotaiba O. Ababneh, Ismail M. Saadoun [et al.] // BMC Microbiol. – 2009. – Vol. 9. – P. 225.

314. Jayaro B. M. A study on the prevalence of gram-negative bacteria in bulk tank milk / B. M. Jayaro, L. Wang // Journal of Dairy Science. – 1999. – Vol. 82. – P. 2620–2624.

315. Jaykus L.-A. The application of quantitative risk assessment to microbial safety risks / L.-A. Jaykus // Critical Reviews in Microbiology. – 1996. – Vol. 22 (4). – P. 279–293.

316. Jeyamkondana S. Microbial growth modelling with artificial neural networks / S. Jeyamkondana, D. S. Jayasa, R. A. Holleyb // Int. J. Food Microbiol. – 2001. – Vol. 64. – P. 343–354.

317. Jimenez S. M. The role of visible faecal material as a vehicle for generic *Escherichia coli*, coliform, and other enterobacteria contaminating poultry carcasses during slaughtering / S. M. Jimenez, M. C. Tiburzi, M. S. Salsi [et al.] // J. Of Appl. Microbiol. – 2003. – Vol. 95. – P. 451–456.

318. Joke rR. N. A case of neonatal meningitis caused by a yellow enterobacter / R. N. Joker, T. Norholm, K. E. Siboni // Dan. Med. Bull. – 1965. – Vol. 12. – P. 128–130.

319. Joosten H. A rapid and reliable alternative to ISO 21528-1:2004 for detection of *Enterobacteriaceae* / H. Joosten, J. Marugg, R. Stephan [et al.] // Int. J. Food Microbiol. – 2008. – Vol. 125 (3). – P. 344–346.

320. Joshua B. *Enterobacter sakazakii* : A coliform of increased concern to infant health / B. Gurtler, J. L. Kornacki, L. R. Beuchaa // Int. J. Food Microbiol. – 2005. – Vol. 104. – P. 1–34.

321. Jung M. K. Prevalence and thermal stability of *Enterobacter sakazakii* from unprocessed ready-to-eat agricultural products and powdered infant formulas / M-K. Jung, J. H. Park // Food Sci. Biotechnol. – 2006. – Vol. 15. – P. 152–157.

322. Kandhai M. C. Occurrence of *Enterobacter sakazakii* in food production environments and households / M. C. Kandhai, M. W. Reij, L. G. Gorris [et al.] // Lancet. – 2004. – Vol. 363. – P. 39–40.

323. Kandhai M. C. A new protocol for the detection of *Enterobacter sakazakii* applied to environmental samples / M. C. Kandhai, M. Reij, K. Van Puyvelde [et al.] // J. Food Protect. – 2004. – Vol. 67. – P. 1267–1270.

324. Kandhai M. C. Effects of preculturing conditions on lag time and specific growth rate of *Enterobacter sakazakii* in reconstituted powdered infant

formula / M. C. Kandhai, M. W. Reij, M. Grogno [et al.] // Appl. Envir. Microbiol. – 2006. – Vol. 72. – P. 2721–2722.

325. Kandhai M. C. A study into the occurrence of *Cronobacter* spp. in The Netherlands between 2001 and 2005 / M. C. Kandhai, A. E. Heuvelink, M. W. Reij [et al.] // Food Control. – 2010. – Vol. 21, № 8. – P. 1127–1136.

326. Kandhai M. C. Detection, occurrence, growth and inactivation of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*): Thesis Submitted in fulfilment of the requirements for the degree of doctor / M. C. Kandhai. – Wageningen University, 2010. – 242 p.

327. Kanivets V. I. Bacterial microflora on disinfected sugar beet seeds / V. I. Kanivets, I. N. Pishchur // Microbiology. – 2001. – Vol. 70. – P. 316–318.

328. Kemp F. Detection of *Enterobacter sakazakii* in South African food products : Thesis of master degree/ FrancискаKemp // Department of food sciences, Stellenbosch University, 2005. – 71 p.

329. Keyser M. Treatment of winery effluent with upflow anaerobic sludge blanket (UASB)-granular sludges enriched with *Enterobacter sakazakii* / M. Keyser, R. C. Witthuhn, L. C. Ronquest [et al.] // Biotechnol. Lett. – 2003. – Vol. 25. – P. 1893–1898.

330. Khan A. A. Rapid method for the detection of genetically engineered microorganisms by polymerase chain reaction from soil and sediments / A. A. Khan, R. A. Jones, C. E. Cerniglia // J. Ind. Microbiol. Biotech. – 1998. – Vol. 20. – P. 90–94.

331. Khanzadi S. Application of artificial neural networks to predict *Clostridium botulinum* growth as a function of *Zataria Multiflora* essential oil, pH, NaCl and temperature / S. Khanzadi, S. Gharibzadeh, M. Reza Raoufy [et al.] // J. Food Safety. – 2010. – Vol. 30, № 2. – P. 490–505.

332. Kim H. Survival and growth of *Enterobacter sakazakii* on fresh-cut fruits and vegetables and in unpasteurized juices as affected by storage temperature / H. Kim, L. R. Beuchat // J. Food Protect. – 2005. – Vol. 68. – P. 2541–2552.

333. Kim H. Attachment of and biofilm formation by *Enterobacter sakazakii* on stainless steel and enteral feeding tubes / H. Kim, J.-H. Ryu, L. R. Beuchat // Appl. and Environ. Microbiol. – 2006. – Vol. 72. – P. 5846–5856.

334. Kim H. Survival of *Enterobacter sakazakii* on fresh produce as affected by temperature, and effectiveness of sanitizers for its elimination / H. Kim, J.-H. Ryu, L. R. Beuchat // Int. J. Food Microbiol. – 2006. – Vol. 111. – P. 134–143.

335. Kim H. Effectiveness of disinfectants in killing *Enterobacter sakazakii* in suspension, dried on the surface of stainless steel, and in a biofilm / H. Kim, J.-H. Ryu, L. R. Beuchat // App. Environ. Microbiol. – 2007. – Vol. 73. – P. 1256–1265.

336. Kim H. Fate of *Enterobacter sakazakii* attached to or in biofilms on stainless steel upon exposure to various temperatures or relative humidities / H. Kim, J. Bang, L. R. Beuchat [et al.] // J. Food Protect. – 2008. – Vol. 71. – P. 940–945.
337. Kim H. Prevalence and genetic diversity of *Enterobacter sakazakii* in ingredients and of infant foods / H. Kim, S. S. Jang, S. K. Kim [et al.] // Int. J. Food Microbiol. – 2008. – Vol. 122. – P. 196–203.
338. Kim H. Microbiological examination of vegetable seed sprouts in Korea / H. Kim, Y. Lee, L. R. Beuchat [et al.] // J. Food Protect. – 2009. – Vol. 72. – P. 856–859.
339. Kleiman M. B. Meningoencephalitis and compartmentalization of the cerebral ventricles caused by *Enterobacter sakazakii* / M. B. Kleiman, S. D. Allen, P. Neal [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 1981. – Vol. 14. – P. 352–354.
340. Kluwer A. Microorganisms in Foods / A. Kluwer // Microbiological testing in food safety management. – ICMSF Plenum Publishers, New York, USA, 2002. – 450 p.
341. Kongo J. M. Monitoring and identification of bacteria associated with safety concerns in the manufacture of São Jorge, a Portuguese traditional cheese from raw cow's milk / J. M. Kongo, A. P. Gomes, F. X. Malcata // J. Food Protect. – 2008. – Vol. 71 (5). – P. 986–992.
342. Kraemer I. Untersuchungen zum Vorkommen von *Enterobacter sakazakii* in Speiseeis mit real-time-PCR-Verfahren: Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde / I. Kraemer. – der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München, 2008. – 88 p.
343. Kumar C. G. Significance of microbial biofilms in the food industry: a review / C. G. Kumar, S. K. Anand // Int. J. Food Microbiol. – 1998. – Vol. 42. – P. 9–27.
344. Kuzina L. V. Isolation and identification of bacteria associated with adult laboratory Mexican fruit flies, *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) / L. V. Kuzina, J. J. Peloquin, D. C. Vacek [et al.] // Curr. Microbiol. – 2001. – Vol. 42. – P. 290–294.
345. Kusumaningrum H. D. Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods / H. D. Kusumaningrum, G. Riboldi, W. C. Hazeleger [et al.] // Int. J. Food Microbiol. – 2003. – Vol. 85 (3). – P. 227–236.
346. Lafarge V. Raw cow milk bacterial population shifts attributable to refrigeration / V. Lafarge, J. C. Ogier, V. Girard [et al.] // App. Environ. Microbiol. – 2004. – Vol. 70. – P. 5644–5650.
347. Lai K. K. *Enterobacter sakazakii* infections among neonates, infants, children, and adults – Case reports and a review of the literature / K. K. Lai // Medicine. – 2001. – Vol. 80. – P. 113–122.

348. Lammerding A. M. An overview of microbial food safety risk assessment / A. M. Lammerding // *J. Food Protect.* – 1997. – Vol. 60 (11). – P. 1420–1425.
349. Lammerding A. M. Quantitative risk assessment: an emerging tool for emerging foodborne pathogens / A. M. Lammerding, G. M. Paoli // *Emerg. Infect. Dis.* – 1997. – Vol. 3. – P. 483–487.
350. Lammerding A. M. Hazard identification and exposure assessment for microbial food safety risk assessment / A. M. Lammerding, A. Fazil // *Int. J. Food Microbiol.* – 2000. – Vol. 58 (3). – P. 147–157.
351. Lampel K. A. Method for the isolation and detection of *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter*) from powdered infant formula / K. A. Lampel, Y. Chen // *Int. J. Food Microbiol.* – 2009. – Vol. 136, № 2. – P. 179–184.
352. Lankveld J. Quality, safety and value optimisation of the milk supply chain in rapidly evolving central and eastern European markets [Electronic resource] / J. Lankveld, R. Marteiijn. – Wageningen University, 2005. – Access mode : /<http://www.optimilk.net>.
353. Laying down the general principles and requirements of food law, establishing the European Food Safety Authority and laying down procedures in matters of food safety: Regulation (EC) № 178/2002 of The European Parliament and of the Council of 28 January 2002 // *Official Journal of the European Union.* – 2002. – 24 p.
354. Laying down specific hygiene rules for food of animal origin : Regulation (EC) № 853/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 // *Official Journal of the European Union.* – 2004. – 61 p.
355. Laying down specific rules for the organisation of official controls on products of animal origin intended for human consumption : Regulation (EC) № 854/2004 of The European Parliament and of the Council of of 29 April 2004 // *Official Journal of the European Union.* – 2004. – 45 p.
356. Leclerc H. Advances in the bacteriology of the coliform group: their suitability as markers of microbial water safety / H. Leclerc, D. A. Mossel, S. C. Edberg [et al.] // *Ann. Rev. Microbiol.* – 2001. – Vol. 55. – P. 201–234.
357. Leclercq A. Comparison of fecal coliform agar and violet red bile lactose agar for fecal coliform enumeration in foods / A. Leclercq, C. Wanegue, P. Baylac // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2002. – Vol. 68. – P. 1631–1633.
358. Lee D. G. Bacterial species in biofilm cultivated from the end of the Seoul water distribution system / D. G. Lee, S. J. Kim // *J. Appl. Microbiol.* – 2003. – Vol. 95. – P. 317–324.

359. Legan J. D. Determining the concentration of microorganisms controlled by attributes sampling plans / J. D. Legan, M. H. Vandeven, S. Dahms [et al.] // *Food Control*. – 2001. – Vol. 12 (3). – P. 137–147.
360. Lehner A. 16S rRNA gene based analysis of *Enterobacter sakazakii* strains from different sources and development of a PCR assay for identification / A. Lehner, T. Tasara, R. Stephan // *BMC Microbiol.* – 2004. – Vol. 4. – P. 43–48.
361. Lehner A. Microbiological, epidemiological and food safety aspects of *Enterobacter sakazakii* / A. Lehner, R. Stephan // *J. Food Protect.* – 2004. – Vol. 67 (12). – P. 2850–2857.
362. Lehner A. Biofilm formation, EPS (extracellular polysaccharide production) production and cell to cell signalling in various *Enterobacter sakazakii* strains: aspects promoting environmental persistence / A. Lehner, K. Riedel, L. Eberl [et al.] // *J. Food Protect.* – 2005. – Vol. 68. – P. 2287–2294.
363. Lehner A. Comparison of two chromogenic media and evaluation of two molecular based identification systems for *Enterobacter sakazakii* detection / A. Lehner, S. Nitzsche, P. Breeuwer [et al.] // *BMC Microbiol.* – 2006. – № 23, Vol. 6. – P. 15.
364. Lehner A. Identification of *Enterobacteriaceae* and *Cronobacter spp* in raw milk, milk concentrate and milk powder: prevalence and genotyping / A. Lehner, C. Fricker-Feer, K. Gschwend [et al.] // *Arch. Lebensmittelhyg.* – 2010. – Vol. 61. – P. 22–26.
365. Leon G. M. Gorris Food safety objective: An integral part of food chain management / G. M. Gorris Leon // *Food Control*. – 2005. – Vol. 16, № 9. – P. 801–809.
366. Leuschner R.-G. K. A medium for the presumptive detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula / R.-G. K. Leuschner, F. Baird, B. Donald [et al.] // *Food Microbiol.* – 2004. – Vol. 21 (5). – P. 527–533.
367. Lin L.-C. Survival and growth of *Enterobacter sakazakii* in infant cereal as affected by composition, reconstitution liquid, and storage temperature / L.-C. Lin, L. R. Beuchat // *J. Food Protect.* – 2007. – Vol. 70. – P. 1410–1422.
368. Lin L.-C. Survival of *Enterobacter sakazakii* in infant cereal as affected by composition, water activity, and temperature / L.-C. Lin, L. R. Beuchat // *Food Microbiol.* – 2007. – Vol. 24. – P. 767–777.
369. Lindqvist R. Quantitative microbial risk assessment exemplified by *Staphylococcus aureus* in unripened cheese made from raw milk / R. Lindqvist, S. Sylven, I. Vagsholm // *Int. J. Food Microbiol.* – 2002. – Vol. 78 (1–2). – P. 155–170.

370. Liu Y. PCR oligonucleotide array for detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula / Y. Liu, Q. Gao, X. Zhang [et al.] // *Molecular Cell Probes*. – 2005. – Vol. 20. – P. 11–17.
371. Liu Y. Real time PCR using TaqMan and SYBR Green for detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula / Y. Liu, X. Cai, X. Zhang, O. Gao // *J. Microbiol. Meth.* – 2006. – Vol. 65. – P. 21–31.
372. Manafi M. Comparison of Three Chromogenic Media for Detection of *Enterobacter sakazakii* [Electronic resource] / M. Manafi, K. Lang. – Medical University of Vienna, Kinderspitalgasse, Vienna, 2007. – Poster1095. – Access mode : www.pdfactory.com.
373. Mange J. P. Adhesive properties of *Enterobacter sakazakii* to human epithelial and brain microvascular endothelial cells / J. P. Mange, R. Stephan, N. Borel [et al.] // *BMC Microbiol.* – 2006. – Vol. 6. – P. 58–65.
374. Marks H. M. Topicsin microbial risk assessment: dynamic flow tree process / H. M. Marks, M. E. Coleman, C. T. J. Lin [et al.] // *RiskAnal.* – 1998. – Vol. 18 (3). – P. 309–328.
375. Masaki H. Detection of gram-negative bacteria in patients and hospital environment at a room in geriatric wards under the infection control against MRSA / H. Masaki, N. Asoh, M. Tao [et al.] // *Kansenshogaku Zasshi*. – 2001. – Vol. 75. – P. 144–150.
376. McDonald K. Predictive food microbiology for the meat industry: a review / K. McDonald, Da-Wen Sun // *Int. J. Food Microbiol.* – 1999. – Vol. 52. – P. 1–27.
377. McMeekin T. A. Predictive microbiology: providing a knowledge-based framework for change management / T. A. McMeekin, T. Ross // *Int. J. Food Microbiol.* – 2002. – Vol. 78, № 1–2. – P. 133–153.
378. McMeekin T. A. Predictive microbiology: towards the interface and beyond / T. A. McMeekin, J. Olley, D. A. Ratkowsky [et al.] // *Food Microbiol.* – 2002. – Vol. 73. – P. 395–407.
379. Microbiological criteria for foodstuff: Commission Regulation (EC) № 2073/2005 of 15 November 2005 / *Official Journal of the European Union*. – 2005. – 26 p.
380. Microbiological criteria for foodstuffs as regards *Enterobacteriaceae* in pasteurised milk and other pasteurised liquid dairy products and *Listeria monocytogenes* in food grade salt: Commission Regulation (EU) № 365/2010 of 28 April 2010 amending Regulation (EC) № 2073/2005 / *Official Journal of the European Union*. – 2010. – 3 p.
381. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the detection and enumeration of *Enterobacteriaceae*. – Part 1: Detection and MPN

technique with pre-enrichment : ISO 21528-1:2004. – Geneva : International Organization for Standardization, 2004. – 8 p.

382. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal methods for the detection and enumeration of *Enterobacteriaceae*. – Part 2: Colony-count method : ISO 21528-2:20042004. – Geneva : International Organization for Standardization, 2004. – 12 p.

383. Milk and milk products. Detection of *Enterobacter sakazakii*: ISO/TS 22964:2006 (E) IDF/RM 210:2006 (E). – International Organization for Standardization, 2006. – 6 p.

384. Miranda C. D. Diversity of tetracycline resistance genes in bacteria from Chilean salmon farms / C. D. Miranda, C. Kehrenberg, C. Ulep // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2003. – Vol. 47. – P. 883–888.

385. Mohan Nair M. K. Cloning and sequencing of the *ompA* gene of *Enterobacter sakazakii* and development of an *ompA*-targeted PCR for rapid detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula / M. K. Mohan Nair, K. S. Venkitanarayanan // Appl. Environ. Microbiol. – 2006. – Vol. 72. – P. 2539–2546.

386. Molloy C. Examination of cattle faeces, dairy farm and food environs for the presence of *E. sakazakii* : 21st International Committee for Food Microbiology and Hygiene Symposium, Evolving Microbial Food Quality and Safety (1–4 September, Aberdeen, Scotland, 2008) / C. Molloy, C. Cagney, S. Fanning [et al.]. – Scotland, 2008. – P. 504.

387. Molloy C. Surveillance and characterisation by Pulsed-Field Gel Electrophoresis of *Cronobacter* spp. in farming and domestic environments, food production animals and retail foods / C. Molloy, C. Cagney, S. O'Brien [et al.] // Int. J. Food Microbiol. – 2009. – Vol. 136, № 2. – P. 198–203.

388. Molloy C. Survival Characteristics of *Cronobacter* spp. in Model Bovine Gut and in the Environment / C. Molloy, C. Cagney, S. Fanning [et al.] // Foodborne Pathogens and Disease. – 2010. – Vol. 7 (6). – P. 671–675.

389. Monroe P. W. Bacteremia associated with *Enterobacter sakazakii* (yellow pigmented *Enterobacter cloacae*) / P. W. Monroe, W. L. Tift // J. Clin. Microbiol. – 1979. – Vol. 10. – P. 850–851.

390. Mramba F. Isolation of *Enterobacter sakazakii* from stable flies, *Stomoxys calcitrans* L. (Diptera : Muscidae) / F. Mramba, A. Broce, L. Zurek // J. Food Prot. – 2006. – Vol. 69. – P. 671–673.

391. Mullane N. R. *Enterobacter sakazakii*: biological properties and significance in dried infant milk formula (IMF) powder / N. R. Mullane, D. Drudy, P. Whyte [et al.] // Int. J. Dairy Technol. – 2006. – Vol. 59. – P. 102–111.

392. Mullane N. R. Application of pulsed-field gel electrophoresis to characterize and trace the prevalence of *Enterobacter sakazakii* in an infant formula processing facility / N. R. Mullane, P. Whyte, P. G. Wall [et al.] // Int. J. Food Microbiol. – 2007. – Vol. 116. – P. 73–81.
393. Mullane N. R. Dissemination of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) in a Powdered Milk Protein Manufacturing Facility / N. Mullane, B. Healy, J. Meade [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 2008. – Vol. 74 (19). – P. 5913–5921.
394. Musgrove M. T. Identification of *Enterobacteriaceae* from washed and unwashed commercial shell eggs / M. T. Musgrove, D. R. Jones, J. K. Northcutt [et al.] // J. Food Protect. – 2004. – Vol. 67. – P. 2613–2616.
395. Muytjens H. L. Analysis of eight cases of neonatal meningitis and sepsis due to *Enterobacter sakazakii* / H. L. Muytjens, H. C. Zanen, H. J. Sonderkamp [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 1983. – Vol. 18. – P. 115–120.
396. Muytjens H. L. Enzymatic profiles of *Enterobacter sakazakii* and related species with special reference to the a-glucosidase reaction and reproducibility of the test system / H. L. Muytjens, J. van der Ros-van de Repe, H. A. M. van Druten. // J. Clin. Microbiol. – 1984. – Vol. 20. – P. 684–686.
397. Muytjens H. L. Quality of powdered substitutes for breast milk with regard to members of the family *Enterobacteriaceae* / H. L. Muytjens, H. Roelofs-Willemse, G. H. Jaspas // J. Clin. Microbiol. – 1988. – Vol. 26 (4). – P. 743–746.
398. Muytjens H. L. *Enterobacter sakazakii* meningitis in neonates: causative role of formula / H. L. Muytjens, L. A. Kollee // Pediatric Infectious Disease. – 1990. – Vol. 9. – P. 372–385.
399. Naqvi S. H. Cefotaxime therapy of neonatal gram-negative bacillary meningitis / S. H. Naqvi, M. A. Maxwell, L. M. Dunkle // Pediatr. Infect. Dis. – 1985. – Vol. 4. – P. 499–502.
400. Nazarowec-White M. Thermal resistance of *Enterobacter sakazakii* in reconstituted dried-infant formula / M. Nazarowec-White, J. M. Farber // Letters in Appl. Microbiol. – 1997. – Vol. 24. – P. 9–13.
401. Nazarowec-White M. Incidence, survival and growth of *Enterobacter sakazakii* in infant formula / M. Nazarowec-White, J. M. Farber // J. Food Protect. – 1997. – Vol. 60, № 3. – P. 226–230.
402. Nazarowec-White M. *Enterobacter sakazakii*: a review / M. Nazarowec-White // Int. J. Food Microbiol. – 1997. – Vol. 34. – P. 103–113.
403. Nazarowec-White M. Predictive modelling of *Enterobacter sakazakii* inactivation in bovine milk during high-temperature short-time pasteurization / M. Nazarowec-White // Food Research International. – 1999. – Vol. 32. – P. 375–379.

404. Nazarowec-White M. Phenotypic and genotypic typing of food and clinical isolates of *Enterobacter sakazakii* / M. Nazarowec-White, J. M. Farber // J. Med. Microbiol. – 1999. – Vol. 48. – P. 559–567.
405. Nauta M. J. Separation of uncertainty and variability in quantitative microbial risk assessment models / M. J. Nauta // Int. J. Food Microbiol. – 2000. – Vol. 57 (1–2). – P. 9–18.
406. Nauta M. J. Modelling bacterial growth in quantitative microbiological risk assessment: is it possible? / M. J. Nauta // Int. J. Food Microbiol. – 2002. – Vol. 73 (2–3). – P. 297–304.
407. Nketsia-Tabiri J. Optimizing processing conditions for irradiated cured fish / J. Nketsia-Tabiri, A. Adu-Gyamfi, K. G. Montford [et al.] // Int. Atomic Energy Agency Technical Document. – 2003. – Vol. 1337. – P. 207–216.
408. Noriega F. R. Nosocomial bacteremia caused by *Enterobacter sakazakii* and *Leuconostoc mesenteroides* resulting from extrinsic contamination of infant formula / F. R. Noriega, K. L. Kotloff, M. A. Martin [et al.] // Pediatr. Infect. Dis. J. – 1990. – Vol. 9. – P. 447–449.
409. Norma L. Heredia Microbiologically Safe Foods / Norma L. Heredia, Jose Santos Garcia, Irene V. Wesley. – JWBSO, Hredia, 2009. – 650 p.
410. Norrakiah A. S. *Cronobacter (Enterobacter) sakazakii, Enterobacteriaceae* and aerobic plate count in raw and pasteurized milk : 1st International Conference on Cronobacter / A. S. Norrakiah, S. MdZ. Noorzatul, LimYenYi. – 2009. – Poster 56.
411. Official controls performed to ensure the verification of compliance with feed and food law, animal health and animal welfare rules: Regulation (EC) № 882/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 // Official Journal of the European Union. – 2004. – 6 p.
412. Ogier J. C. Molecular fingerprinting of dairy microbial ecosystems by use of temporal temperature and denaturing gradient gel electrophoresis / J. C. Ogier, V. Lafarge, V. Girard [et al.] // App. and Environ. Microbiol. – 2004. – Vol. 70. – P. 5628–5643.
413. Oh S. W. Fluorogenic Selective and Differential Medium for Isolation of *Enterobacter sakazakii* / S. W. Oh, D. H. Kang // Appl. Environ. Microbiol. – 2004. – Vol. 70, № 9. – P. 5692–5694.
414. Oh S. W. Comparison of enrichment broths for detection and isolation of *Enterobacter sakazakii* from infant formula milk / S. W. Oh, H.-J. Chung, D. H. Kang // J. Rapid Methods & Automation in Microbiol. – Vol. 14, № 4. – P. 325–336.

415. Oliver E. D. Atypical, non-lactose fermenting isolates shown to be totalcoliforms by the β -galactosidase (ONPG) reaction : WaterTechnology Conference / E. D. Oliver. – AWWA, 1997. – P. 225–231.
416. Onaka K. Powdered infant formula milk contaminant with *Enterobacter sakazakii* / K. Onaka, K. Furuhashi, M. Hara and M. Fukuyama // J. Infec. Dis. – 2010. Vol. 63. – P. 103–107.
417. Osaili T. M. Detergent and sanitizer stresses decrease the thermal resistance of *Enterobacter sakazakii* in infant formula / T. M. Osaili, R. R. Shaker, A. N. Olaimat [et al.] // J. Food Science. – 2008. – Vol. 73. – P. 154–157.
418. Osaili T. M. Effect of environmental stresses on the sensitivity of *Enterobacter sakazakii* in powdered infant milk formula to gamma radiation / T. M. Osaili, A. Al-Nabulsi, R. Shaker [et al.] // Lett. App. Microbiol. – 2008. – Vol. 47. – P. 79–84.
419. Osaili T. M. Heat resistance of *Cronobacter species (Enterobacter sakazakii)* in milk and special feeding formula / T. M. Osaili, R. R. Shaker, M. S. Al-Haddaq [et al.] // J. Appl. Microbiol. – 2009. – Vol. 107, № 3. – P. 928–935.
420. Osterblad M. Antimicrobial susceptibility of *Enterobacteriaceae* isolated from vegetables / M. Osterblad, O. Pensala, M. Peterzens [et al.] // J. Antimicrob. Chemother. – 1999. – Vol. 43. – P. 503–509.
421. Pagotto Franco J. *Enterobacter sakazakii*: Infectivity and enterotoxin production invitro and in vivo / Franco J. Pagotto // J. Food Protect. – 2003. – Vol. 66 (3). – P. 370–375.
422. Palmer S. Early qualitative risk assessment of the emerging zoonotic potential of animal diseases / S. Palmer, D. Brown, D. Morgan // British Medical Journal. – 2005. – P. 1256–1260.
423. Paoli G. Overview of a RiskAssessment Model for *Enterobacter sakazakii* in Powdered Infant Formula / G. Paoli, E. Hartnett // FAO, Canada, 2006. – 31 p.
424. Papademas P. Food safety management systems (FSMS) in the dairy industry: a review / P. Papademas, T. Bintsis // Int. J. Dairy Technol. – 2010. – Vol. 63, № 4. – P. 489–503.
425. Pei X. Y. The Survey of *Cronobacter* spp. (formerly *Enterobacter sakazakii*) in Infant and Follow-up Powdered Formula in China in 2012 / X. Y. Pei, L. Yan, J. H. Zhu, N. Li, Y. C. Guo // Biomed. Environ. Sci. – 2016. – Vol. 29 (2). – P. 99–106.
426. Prats C. Individual-based modelling of bacterial cultures to study the microscopic causes of the lag phase / C. Prats, D. Lopez, A. Giro [et al.] // J. Theoretical Biology. – 2006. – Vol. 241 (4). – P. 939–953.

427. Principles and guidelines for incorporating microbiological risk assessment in the development of food safety standards, guidelines and related texts : Technical report Food Agriculture Organisation of the United Nations [Electronic resource] / World Health Organisation. – Kiel, Germany, 18–22 March 2002. – 47 p. – Access mode:

<http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/march2002/en/index.html>.

428. Principles and guidelines for the conduct of microbiological risk assessment: Technical report Codex Alimentarius Commission (CAC/GL-30) [Electronic resource]. – 1999. – 6 p. – Access mode : <http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/cac1999/en/>.

429. Principles for the establishment and application of microbiological criteria for foods / Codex Alimentarius Commission (CAL/GL-21) [Electronic resource]. – 1997. – 3 p. – Access mode :

<http://www.freshquality.org/files/Microbiological.pdf>.

430. Proposed Draft Code of Hygienic Practice for Powdered Formulae for Infants and Young Children at Step 3: Joint FAO/WHO Food Standards Programme (CX/FH06/38/7) [Electronic resource] / Codex Committee on Food Hygiene. – Rome : FAO/WHO, 2006. – 24 p. – Access mode :

<http://ftp.fao.org/codex/ccfh39/fh3904ae.pdf>.

431. Raghav M. Purification and characterization of *Enterobacter sakazakii* enterotoxin / M. Raghav, P. K. Aggarwal // Canadian J. Microbiol. – 2007. – Vol. 53, № 6. – P. 750–755.

432. Raghav M. Isolation and characterization of *Enterobacter sakazakii* from milk foods and environment / M. Raghav, P. K. Aggarwal // Milchw. Milk Sci. Int. – 2007. – Vol. 62. – P. 266–269.

433. Ray P. *Enterobacter sakazakii* in infants: Novel phenomenon in India / P. Ray, A. Das, V. Gautam [et al.] // Indian. J. Med. Microbiol. – 2007. – Vol. 25. – P. 408–410.

434. Restaino I. A chromogenic plating medium for the isolation and identification of *Enterobacter sakazakii* from foods, food ingredients and environmental sources / I. Restaino, E. W. Frampton, W. C. Lionberg [et al.] // J. Food. Protect. – 2006. – Vol. 69 (2). – P. 315–322.

435. Richards G. M. Survival and growth of *Enterobacter sakazakii* in infant rice cereal reconstituted with water, milk, liquid infant formula, or apple juice / G. M. Richards, J. B. Gurtler, L. R. Beuchat // J. Appl. Microbiol. – 2005. – Vol. 99. – P. 844–850.

436. Risk assessment of food borne bacterial pathogens: Quantitative methodology relevant for human exposure assessment : Technical report // European

Commission. – 2002. – 84 p. – Access mode : http://ec.europa.eu/food/fs/sc/ssc/out252_en.pdf.

437. Risk Characterization of Microbiological Hazards in Food: Guidelines [Electronic resource] / World Health Organization Food and Agriculture of the USA, 2009. – 135 p.

438. Roberts T. A. Microorganisms in Foods: Microbiological specifications of food pathogens / T. A. Roberts, A. C. Baird-Parker, R. B. Tompkin // International Commission on Microbiological Specifications for Foods. – 1996. – 200 p.

439. Robins-Browne R. M. Food Microbiology Fundamentals and Frontiers / R. M. Robins-Browne. – 2 edn. – American Society for Microbiology Press, Washington D. C., 2001. – 320 p.

440. Roig-Sagués A. X. Histamine and tyramine-forming microorganisms in Spanish traditional cheeses / A. X. Roig-Sagués, A. P. Molina, M. M. Hernández-Herrero // European Food Research Technology. – 2002. – P. 96–110.

441. Ronald J. W. A study of the Gamma hypothesis: Predictive modelling of the growth and inhibition of *Enterobacter sakazakii* / J. W. Ronald, E. B. Lambert // Int. J. Food Microbiol. – 2007. – Vol. 115, № 2. – P. 204–213.

442. Ross T. Predictive microbiology / T. Ross, T. A. McMeekin // Int. J. Food Microbiology. – 1994. – Vol. 23. – P. 241–264.

443. Salmon S. A. Minimum inhibitory concentrations for selected antimicrobial agents against organisms isolated from the mammary glands of dairy heifers in New Zealand and Denmark / S. A. Salmon, J. L. Watts, F. M. Aarestrup [et al.] // J. Dairy Sci. – 1998. – Vol. 81. – P. 570–578.

444. Sanaa O. Y. Incidence of some potential pathogens in raw milk in Khartoum North (Sudan) and their susceptibility to antimicrobial agents / O. Y. Sanaa, E. A. Nazik, E. M. Ibtisam [et al.] // J. Animal and Veterinary Advances. – 2005. – Vol. 4 (3). – P. 341–344.

445. Schaffner Donald W. Microbial risk analysis of foods / Donald W. Schaffner. – N. W. Washington, USA, 2008. – 270 c.

446. Schindler P. R. G. Coliform bacteria in drinking water from South Bavaria: identification by the API 20E-system and resistance patterns / P. R. G. Schindler, H. Metz // Water Sci. Technol. – 1991. – Vol. 24. – P. 81–84.

447. Schothorst M. Relating Microbiological Criteria to Food Safety Objectives and Performance Objectives / M. Schothorst, M. H. Zwietering, T. Ross [et al.] // Food Control. – 2009. – Vol. 20. – P. 967–979.

448. Scientific opinion of BIOHAZ Panel on the request from the Commission for review of the opinion on microbiological risks in infant formulae and follow-on formulae with regard to *Enterobacteriaceae* as indicators / EFSA-Q, 2006. – 14 p.

449. Simmons B. P. *Enterobacter sakazakii* infections in neonates associated with intrinsic contamination of a powdered infant formula / B. P. Simmons, M. S. Gelfand, M. Haas [et al.] // Infect. Control Hosp Epidemiol. – 1989. – Vol. 10. – P. 398–401.
450. Seo K. H. Rapid, specific detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula using a real-time PCR assay / K. H. Seo, R. E. Brackett // J. Food Prot. – 2005. – Vol. 68 (1). – P. 59–63.
451. Shaker R. Isolation of *Enterobacter sakazakii* and other *Enterobacter* sp. from food and food production environments / R. Shaker, T. Osaili, W. Al-Omary // Food Control. – 2007. – Vol. 18. – P. 1241–1245.
452. Shaker R. Effect of desiccation, starvation, heat and cold stresses on the thermal resistance of *Enterobacter sakazakii* in rehydrated infant milk formula / R. R. Shaker, T. M. Osaili, A. S. All-Hasan [et al.] // J. Food Scien. – 2008. – Vol. 73. – P. 354–359.
453. Shepherd J. The New Zealand experience on the safety of raw milk: Treatment options depending on hazard / J. Shepherd // Conference on a new approach to food safety. Integrated chain management for food safety: from the farm to the consumers' plate. – Canada, 2009. – P. 15.
454. Skladal P. Detection of bacterial contamination in sterile UHT milk as L-lactate biosensor / P. Skladal, M. Mascini, C. Salvadori, G. Zannoni // Enzyme Microb. Technol. – 1993. – Vol. 15. – P. 508–512.
455. Stock I. Natural antibiotic susceptibility of *Enterobacter amnigenus*, *Enterobacter cancerogenus*, *Enterobacter gergoviae* and *Enterobacter sakazakii* strains / I. Stock, B. Wiedemann // Clin. Microbiol. Infect. – 2002. – Vol. 8. – P. 564–78.
456. Suhad S. *Enterobacter sakazakii* – Risikoprofil und Untersuchungen zum Nachweis in Säuglingsnahrungen: Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades am Fachbereich Agrarwissenschaften / S. Suhad // Ökotrophologie und Umweltmanagement der Justus-Liebig-Universität Gießen, Gießen, 2007. – 197 p.
457. Swarte C. Towards an FSO/ALOP based food safety policy / C. Swarte, R. A. Donker // Food Control. – 2005. – Vol. 16, № 9. – P. 825–830.
458. Tamura A. Flavor components and microorganisms isolated from Suanicha (sour tea, Takentsusanicha) / A. Tamura, M. Kato, M. Omori [et al.] // Nippon Kasei Gakkaishi. – 1995. – Vol. 46. – P. 759–764.
459. Todd Ewen C. D. Microbiological safety standards and public health goals to reduce foodborne disease / C. D. Todd Ewen // Meat Science. – 2004. – Vol. 66, № 1. – P. 33–43.
460. The presence of endotoxin in powdered infant formula milk and the influence of endotoxin and *Enterobacter sakazakii* on bacterial translocation in the

infant rat / S. Townsend, J. Caubilla Barron, C. Loc-Carrillo, S. Forsythe // Food Microbiol. – 2007. – Vol. 24. – P. 67–74.

461. The Use of Microbiological Risk Assessment Outputs to Develop Practical Risk Management Strategies: Metrics to improve food safety / Report of a Joint Expert Meeting, FAO/WHO. – Kiel, Germany, 3–7 April, 2006. – 77 p.

462. The WTO Agreements Series Sanitary and Phytosanitary Measures [Electronic resource] / WTO, 2004. – 50 p. – Access mode : http://www.wto.org/english/res_e/booksp_e/agrmntseries4_sps_e.pdf>.

463. The WTO Sanitary and Phytosanitary Measures. Agreement and SPS developments and activities around the world [Electronic resource] / WTO, 2004. – 45 p. – Access mode : http://www.wto.org/english/tratop_e/sps_e/sps_e.htm.

464. Turcovský I. Biochemical and molecular characterization of *Cronobacter* spp. (formerly *Enterobacter sakazakii*) isolated from foods / I. Turcovský, K. Kuniková, H. Drahovská [et al.] // Antonie van Leeuwenhoek. – 2011. – Vol. 99, № 2. – P. 257–269.

465. Urmenyi A. M. Neonatal death from pigmented coliform infection / A. M. Urmenyi, W. Franklin // Lancet. – 1961. – Vol. 1. – P. 313–315.

466. Valero A. Searching for New Mathematical Growth Model Approaches for *Listeria monocytogenes* / A. Valero, R. M. Hervas, Garcia-Gimeno [et al.] // J. of Food Science. – 2007. – Vol. 72, № 1. – P. 116–125.

467. van Acker J. Outbreak of necrotizing enterocolitis associated with *Enterobacter sakazakii* in powdered milk formula / J. van Acker, F. de Smet, G. Muyldermans [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2001. – Vol. 39 (1). – P. 293–297.

468. van Impe J. F. Towards a novel class of predictive microbial growth models / J. F. van Impe, F. Poschet, A. H. Geeraerd [et al.] // Int. J. Food Microbiol. – 2005. – Vol. 100. – P. 97–105.

469. Voysey P. A. Microbiological risk assessment: a new approach to food safety control / P. A. Voysey, M. Brown // Int. J. Food Microbiol. – 2000. – Vol. 58. – P. 173–179.

470. Walls I. Use of predictive microbiology in microbial food safety risk assessment / I. Walls, V. N. Scott // Int. J. Food Microbiol. – 1997. – Vol. 36. – P. 97–102.

471. Watanabe I. Studies on an unusual case of fermentation of meat-products during the curing process / I. Watanabe, M. Esaki // J. Antibact. Antifung. – 1994. – № 22. – P. 9–14.

472. Weiss C. Application and acceptability of three commercial systems for detection of *Enterobacter sakazakii* in ready-to-eat vegetable salads / C. Weiss, B. Becker, W. Holzapfel // Archive Lebensmittelhygiene. – 2005. – Vol. 56. – P. 34–38.

473. Whiting R. C. Determining the microbiological criteria for lot rejection from the performance objective or food safety objective / R. C. Whiting, A. Rainose, R. L. Buchanan [et al.] // *Int. J Food Microbiol.* – 2006. – Vol. 110, № 3. – P. 263–267.
474. Whiting R. C. Establishing the link between microbiological criteria and performance objectives / R. C. Whiting, M. H. Zwietering, T. Ross [et al.] // *Bulletin of the IDF. A Revolution in Food Safety Management.* – 2009. – Chapter 16. – P. 75–80.
475. Willis J. *Enterobacter sakazakii* meningitis in neonates / J. Willis, J. E. Robinson // *Pediatr. Infect. Dis. J.* – 1988. – Vol. 7. – P. 196–199.
476. Yang H. L. Screening, identification and distribution of endophytic associativediazotrophs isolated from rice plants / H. L. Yang, X. L. Sun, W. Song // *Acta Botan. Sin.* – 1999. – Vol. 41. – P. 927–931.
477. Yen Y. L. Characterization of isolated *Cronobacter (Enterobacter) sakazakii* culture using Real-time PCR, Boolog GEN III and ID 32E: 2nd Florence Conference on Phenotype MicroArray Analysis of Microorganisms The Environment, Agriculture, and Human Health / Y. L. Yen, N. A. Sani // Firenze-Italy, September 13–15, 2010. – 78 p.
478. Zogaj X. Production of cellulose and curli fimbriae by members of the family *Enterobacteriaceae* isolated from the human gastrointestinal tract / X. Zogaj, W. Bokranz, M. Nimtz [et al.] // *Infect. Immun.* – 2003. – Vol. 71. – P. 4151–4158.
479. Zwietering M. H. Sensitivity analysis in quantitative microbial risk assessment / M. H. Zwietering, S. J. C. van Gerwen // *Int. J. Food Microbiol.* – 2000. – Vol. 58 (3). – P. 213–221.
480. Zwietering M. H. Practical considerations on food safety objectives / M. H. Zwietering // *Food Control.* – 2005. – Vol. 16, № 9. – P. 817–823.

Наукове видання

Бергілевич Олександра Миколаївна,

Касянчук Вікторія Вікторівна

**ТЕОРЕТИЧНЕ ТА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ
ОЦІНКИ МІКРОБІОЛОГІЧНОГО РИЗИКУ
*CRONOBACTER SPP. (ENTEROBACTER SAKAZAKII)***

Монографія

Художнє оформлення обкладинки Є. О. Каби

Редактори: Н. З. Клочко, С. М. Симоненко

Комп'ютерне верстання О. М. Бергілевич

Формат 60x84/16. Ум. друк. арк. 17,90. Обл.-вид. арк. 19,17. Тираж 300 пр. Зам. №

Видавець і виготовлювач

Сумський державний університет,

вул. Римського-Корсакова, 2, м. Суми, 40007

Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 3062 від 17.12.2007.