

**VIII НАЦИОНАЛЬНЫЙ
КОНГРЕСС БАКТЕРИОЛОГОВ**



**Микробиологическая безопасность пищевых продуктов:
актуальные проблемы и пути решения**

Н.Р. Ефимочкина, С.А.Шевелева
ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии»
efimochkina.natalya@yandex.ru,
sheveleva@ion.ru

Безопасность пищевой продукции – состояние, свидетельствующее об отсутствии недопустимого риска, связанного с вредным воздействием на человека и будущее поколения



Загрязнители химической природы

- ### Контаминанты антропогенного происхождения
- ❖ Токсичные элементы
 - ❖ Пестициды
 - ❖ Нитрозосоединения
 - ❖ ПАУ
 - ❖ ПХБ
 - ❖ Дибензодиоксины и дибензофураны
 - ❖ **Антибиотики**
 - ❖ **Микропластик**
 - ❖ Гормоны и гормоноподобные в-ва

- ### Вещества, образующиеся в процессе приготовления пищи (технологические контаминанты)
- ❖ Нитрозосоединения
 - ❖ ПАУ
 - ❖ Акриламид
 - ❖ 5-оксиметилфурфурол
 - ❖ 4-метилимидазол.

Пищевые вещества в высоких концентрациях

Хром, медь, цинк, железо
Витамины А, D и т.д.

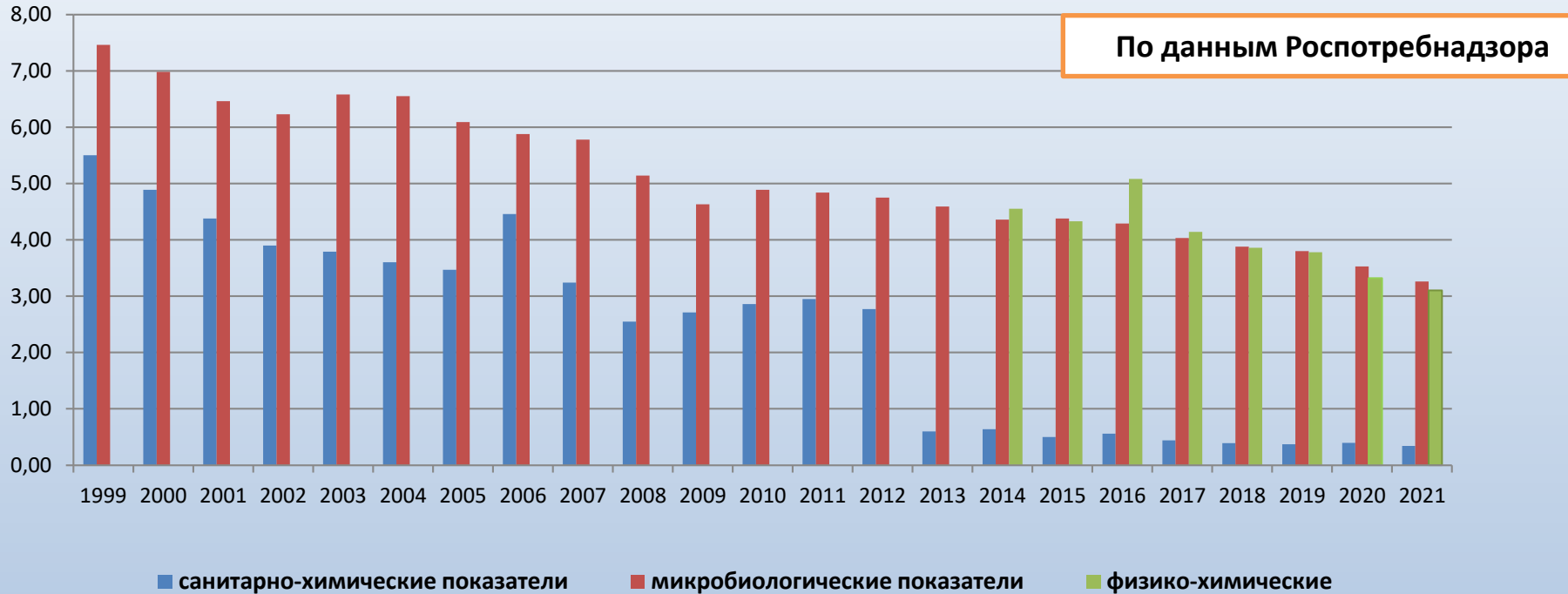
Загрязнители биологического происхождения

- ### Контаминанты природного происхождения
- ❖ **Бактерии и их токсины**
 - ❖ **Вирусы**
 - ❖ **Микроскопические грибы и микотоксины**
 - ❖ Одноклеточные водоросли и фикотоксины
 - ❖ Высшие грибы и их токсины
 - ❖ Простейшие и гельминты
 - ❖ Прионы
 - ❖ Растения и фитотоксины
 - ❖ Токсины животных
 - ❖ Биологически активные вещества

- ### Продукция био- и нанотехнологий
- ❖ Генетически модифицированные организмы растительного и животного происхождения
 - ❖ **Генетически модифицированные микроорганизмы и их токсичные метаболиты**
 - ❖ Наночастицы и наноматериалы

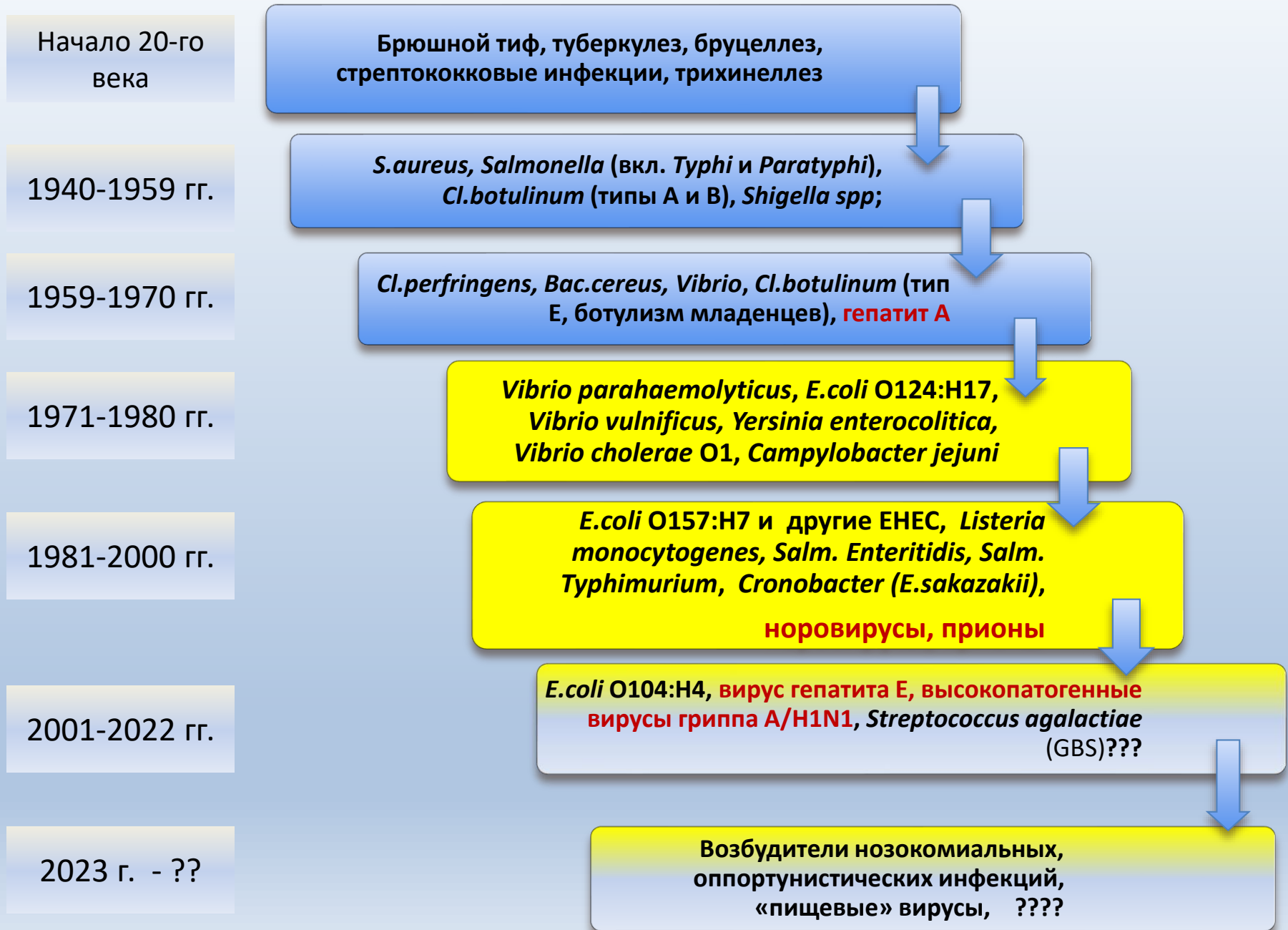
МОНИТОРИНГ БЕЗОПАСНОСТИ ПИЩЕВОЙ ПРОДУКЦИИ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Доля проб пищевой продукции, не соответствующей гигиеническим нормативам по санитарно-химическим, микробиологическим и физико-химическим показателям, 1999-2021 гг., %.



За период 1999-2021гг.
удельный вес проб пищевых продуктов, несоответствующих гигиеническим требованиям, снизился в **16** раз по санитарно-химическим показателям, в **2,3** раза - по микробиологическим показателям

Эволюция приоритетных и новых возбудителей пищевых заболеваний



Факторы, ускоряющие эволюцию и распространение возбудителей инфекций от пищи



ПРИОРИТЕТЫ для прогнозирования, оценки и предупреждения новых рисков

Новые технологии, техногенные стрессовые факторы, биотехнологии, фальсификация пищи, повышение восприимчивости населения

Таксоны – потенциальные источники новых пищевых патогенов:

- *Helicobacter spp* (*H.pullorum*, *H.bilis*, *H. hepaticus*);
- *Mycobacterium paratuberculosis*
- *Campylobacter* и *Arcobacter* (аэротолерантные кампилобактеры)
- *Acinetobacter baumannii*
- *Aeromonas hydrophila*
- *Plesiomonas shigelloides*
- *Pantoea (Erwinia) spp.*

Биотерроризм

Пищевые патогены – потенциальные биологические агенты:

- *Норовирусы*
- Токсины *Cl.botulinum*
- *Salmonella*
- *Shigella*
- *E.coli* O157:H7 и другие ЕНЕС
- *Vibrio cholerae*

Вирусные контаминанты пищевых продуктов

- **Норовирусы**
- **Вирусы гепатита А и Е**
- Ротавирусы
- Аденовирусы
- Астровирусы
- Саповирусы
- Вирусы «птичьего» и «свиного» гриппа
- Вироиды

Вирусы с сегментированной РНК – интрагенные рекомбинации

Потенциал мутаций, преодоления межвидовых барьеров, появление реассортантов

Новые высоко-патогенные вирусы

Новые технологии производства пищевой продукции = новые задачи

- Пищевые продукты, содержащие смешанную микрофлору

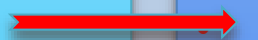
- Технологическая обработка ингибирует активность живых микробов, сохраняя ДНК и антигенные структуры клеток

- Технологии «холодной» пастеризации / стерилизации, бактофугирование

- Обогащение микронутриентами, пребиотиками и пробиотиками:

- Модификация рецептур: консерванты, снижение количества сахара, соли, кислот

- **Новые и нетрадиционные источники пищи**



- Патогены присутствуют в продуктах в малых количествах

- Стимуляция ферментов микробиоты

- Риски контаминации вирусами и микобактериями

- Источники генно-неустойчивых элементов и антибиотикорезистентности

- Опасность выживания споровой токсинообразующей флоры

Новые виды микроорганизмов

ЗАДАЧИ

- Выявление малых количеств патогенов

- Обеспечение более широкого спектра контролируемых микробов и их токсинов

- Определение признаков патогенности и антибиотикорезистентности

- Разработка ускоренных и альтернативных методов анализа бактериальных патогенов

- Разработка эффективных методов детекции вирусных контаминантов

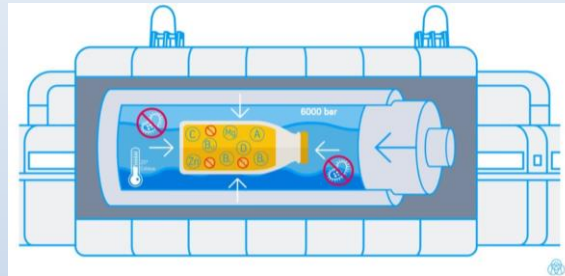
Технологические воздействия

Синтез стрессовых белков

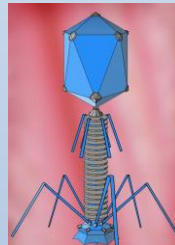
Селекция устойчивых популяций бактерий, обладающих множественными формами толерантности, экспрессия факторов патогенности

Новые пищевые технологии, направленные на подавление микроорганизмов в продуктах

- ❑ Импульсная сушка
- ❑ Радиочастотный нагрев
- ❑ МГА для нарезанных овощей
- ❑ Нетермическая обработка высоким давлением (НРР)



- ❑ Бактериофаги и эндолизины
- ❑ Бактериоцины



Неизвестные механизмы
резистентности
Перенос сцепленных генных
элементов

➡ **Внедрение новых технологий в пищевую индустрию без предварительной оценки микробиологического риска может снижать уровень безопасности продукции**

Изменение традиционных технологий производства пищевых продуктов

Продукт	Технологии	Патоген	Свойства, способствующие распространению
Куры-бройлеры и яйца кур	Корма с мясокостной и с соевой мукой	<i>Salmonella enterica</i>	Более 2500 сероваров, Убиквитарность, широкий круг хозяев – от рептилий до человека
Готовые продукты и блюда	Пролонгация сроков хранения при охлаждении и упаковке в ПГН или МГА	<i>Listeria monocytogenes</i>	Психрофильность, способность к росту при температуре от 1 до 10°C
Сыры полутвёрдые и мягкие	Укорочение срока созревания	Энтеротоксины <i>S.aureus</i> <i>Stx-E.coli</i>	Галофильность, способность к росту и синтезу токсинов в кислой среде
Сухие детские смеси	Поэтапные сублетальные нагревы; ко-пакинг	<i>Cronobacter spp.</i> (<i>S.sakazakii</i>)	Устойчивость к экстремальным для БГКП температурам
Полуфабрикаты из мяса и птицы сырые	Длительное хранение в барьерных упаковках под вакуумом	<i>Clostridium estertheticum</i> , <i>C. frigoriphilum</i> , <i>C. tagluense</i> и др.	Психрофильность, способность к росту и синтезу токсинов в высокобелковых средах

Российская Федерация и ЕАЭС: создана единая система оценки микробиологической безопасности и контроля пищевой продукции

Критерии оценки

- Нормативы допустимых уровней содержания микробных агентов в пище для разных групп населения – **более 3500 нормативов**
- Параметры режимов производства, хранения и реализации продукции
- Процедуры менеджмента качества по принципам HACCP

Единая методология контроля

- Актуальная обновляемая методическая база
- Принципы и методы верификации и экспертизы процедур HACCP, включенные в ГОСТ, МР и отраслевые Инструкции по организации и проведению микробиологического контроля производства продукции и услуг

Включены в **11** Технических регламентов и Единые требования ЕАЭС, в **более 15** Федеральных законов РФ, санитарных правил и СанПиН

1. Полностью охватывает нормируемые показатели, методики анализа которых закрепляются в Перечнях стандартов к ТР ТС и ТР ЕАЭС, для исполнения требований и оценки соответствия к каждому ТР ЕАЭС

2. Используется при государственном контроле (надзоре) и в производстве предприятиях всех уровней

3. Гармонизирована с международными стандартами



Разработка микробиологических нормативов для пищевых продуктов: этапы

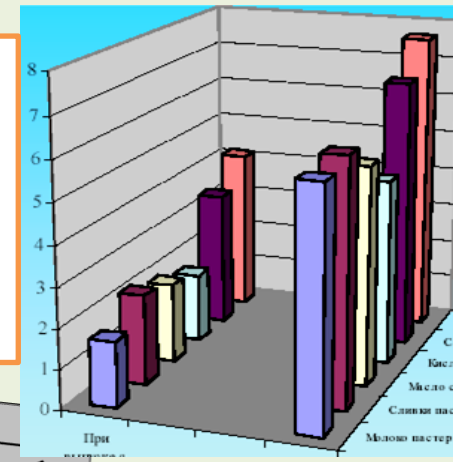
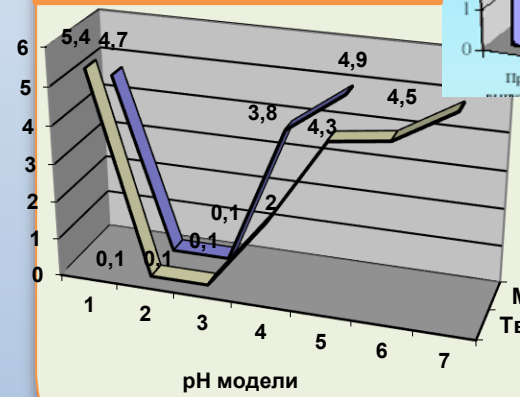
<p>1959-1973</p>	<p>■ Эмпирический подход</p>	<p>Включение индикаторов (ОМЧ и коли-титр) в ГОСТ на готовые продукты в качестве рекомендаций для производителей</p>
<p>1981-1990</p> 	<p>■ Статистика больших массивов микробиологических характеристик продуктов, вырабатываемых на соответствующих санитарным правилам предприятиях, при выпуске в оборот</p> <p>■ Рекомендации ФАО-ВОЗ</p>	<p>Утверждение МЗ СССР для целей гос. контроля продуктов массового потребления:</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ нормативов на ПДУ микроорганизмов: <ul style="list-style-type: none"> ■ санитарно-показательных ■ потенциально-патогенных (УПМ) ■ патогенных ■ возбудителей порчи ■ унифицированных методов контроля, гармонизированных с методами ICMSF ФАО-ВОЗ
<p>1985-1996</p> 	<p>■ Ассоциированное медико-биологическое и технологическое обоснование</p> <p>■ Усовершенствованная методология контроля</p>	<p>Система дифференцированного микробиологического нормирования продуктов детского и диетического питания:</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ ПДУ, адекватные степени восприимчивости потребителей к инфекции в пище ■ унифицированные методы анализа, включающие специальные приёмы выявления патогенов
<p>С начала 2000-х гг. по н/в</p>	<p>Методология ОМР: медико-биологические и эпидемиологические исследования (I), сопоставление с МИД (II), прогноз эффекта (III), математическое моделирование (IV)</p>	<p>Включение показателей по УПМ и патогенам для основных в рационе категорий скоропортящихся продуктов и продуктов - потенциальных источников эмерджентных патогенов</p>

Примеры нормативов и санитарных мер, для разработки которых использованы ОМР или её элементы

[С.А.Шевелева Анализ микробиологического риска как основа для совершенствования системы оценки безопасности и контроля пищевых продуктов, 2007]

Продукт	Показатель	Норма (мера профилактики)	Этапы ОМР
Творог, сметана	БГКП	В 0,001 г не допускается	I, II, III (с моделированием выживаемости в ЖКТ и в обороте)
Сырокопчёные мясoproдукты	<i>E.coli</i>	В 1,0 г не допускается	I, II (с моделированием факторов технологии), частично III
Мясoproдукты в барьерных упаковках	<i>Enterococcus</i> , КОЕ/г	Запрет переупаковки при реализации	I, II
Блюда кулинарные типа фастфуд	<i>S. aureus</i>	В 1,0 г не допускается	I, II
Продукты с пролонгированными сроками годности	Спектр УПМ	Требования к установлению сроков годности и условий хранения	I–III (с эпиданализом)

БГКП *E.coli* (КОЕ/г, lg) :
 В продукте в обороте – рост на 3 порядка
 Частота ЕТЕС в популяции – 28%
 Число порций с 1 МИД (10^6) ЕТЕС – 4%
 В модели желудка – 0,1%



ПДУ колиформ должен быть не более 10^3 КОЕ в 1 г продукта (отсутствие в 0,001 г) при выпуске в оборот

Нормирование эмерджентных бактериальных патогенов

Показатель	Продукты	Норма (мера профилактики)	Вид ОМР или этапы	Документ
<i>Listeria monocytogenes</i>	Массового потребления, поддерживающие рост Для групп риска (дети до 3 лет, беременные и кормящие женщины)	Не допускаются в 25 г (не более 0,04 КОГ/г) в 25, 50 и 100 г	Экспоненциальная стохастическая модель с 12 сценариями потребления для оценки популяционного риска здоровью	ТР ТС 021/2011
<i>E.coli</i> *	Соки свежееотжатые, салаты из сырых овощей и фруктов	Не допускается в 1 г	I, II (с моделированием технологии)	ТР ТС 023 /2011 ТР ТС 021/2011
<i>Campylobacter</i> spp.	Птицепродукты охлаждённые и замороженные	Рекомендации по контролю производства для предотвращения перекрёстной контаминации	I–III (с моделированием in vivo ответа макроорганизма)	СанПиН 3.3686-21

При экспозиции на уровне 0,04 КОЕ/г продукта на этапе реализации риск листериоза от 10^{-7} до 9×10^{-6} (приемлемый).
При экспозиции 100 КОЕ/г риск листериоза неприемлем - для всего населения $6,9 \times 10^{-4}$ и для беременных и кормящих – $2,6 \times 10^{-3}$ – $2,9 \times 10^{-3}$

Для профилактики пищевых зоонозов необходима разработка отраслевых критериев

*) обобщённые требования к отсутствию всех серотипов E.coli, включая Stx-E.coli

[Шевелева С.А. с соавт.
Микробиологическая безопасность пищи:
развитие нормативной и методической базы // Вопросы питания, 2021];
ФБУН «ФНЦ МПТУРЗН» Роспотребнадзора)



Планируемые оценки профилей риска в рамках ОМР для решения о необходимости разработки/пересмотра микробиологических нормативов

Cronobacter sp. (E.sakazakii) в продуктах для детей от 0 до 6 мес

Гармонизация размера выборки, уход от двухстадийного подхода к анализу и увеличение числа исследуемых проб от партии

УПМ в продуктах детского питания на основе гидролизированных белково-полисахаридных экстрактов из зерновых

Продукты нового вида, вырабатываемые по новой технологии и ранее не используемые в пищу

Сульфитредуцирующие клостридии в растительных белках (на основе пшеницы, сои)

Уточнение адекватности установленного норматива для группы продукции в качестве компонента для продуктов детского и лечебного питания

Шига-токсин продуцирующие E.coli (STEC) в пророщенных семенах и нарезанных сырых фруктах

Уточнение величины норматива, установленного для E.coli

Пищевая продукция предприятий общепита, реализуемая без одновременно предоставляемых услуг

Уточнение величины нормативов по УПМ и , установленного для E.coli

Listeria monocytogenes в овощах и грибах замороженных

Расширение спектра потенциально опасных нормируемых продуктов

Психрофильные Clostridium spp. в полуфабрикатах мясных охлаждённых в вакуумной упаковке и ферментированных мясопродуктах из них

Гармонизация с нормативами международных организаций.

Пищевые ингредиенты из альтернативных источников сырья

Микробиологические нормативы безопасности с учетом технологий, целевых продуктов и групп потребителей



**Дополнения (проект Изменений № 2)
в Технический регламент Таможенного союза 021/2011
«О безопасности пищевой продукции»,**

включающие требования безопасности по микробиологическим показателям для новой группы пищевой продукции – овощей и салатов свежих охлажденных промышленного производства, упакованных в полимерные пленки и готовых к употреблению в сыром виде

- салаты листовые цельные свежие	КМАФАнМ, КОЕ/г, не более	5×10^5
	Enterobacteriaceae, КОЕ/г, не более	2×10^2
	E.coli, в 1 г	не допускаются
	патогенные, в т.ч. сальмонеллы в 25 г	не допускаются
	дрожжи, КОЕ/г, не более	5×10^2
	плесени, КОЕ/г, не более	5×10^2
	L. monocytogenes в 25г	не допускаются
- салаты листовые свежие резаные, смеси из салатов и овощей свежих резаных	КМАФАнМ, КОЕ/г, не более	5×10^5
	Enterobacteriaceae, КОЕ/г, не более	5×10^2 (в 3-х пробах из 5-ти) от 5×10^2 до 1×10^3 (в 2-х образцах)
	E.coli, в 1 г	не допускаются
	патогенные, в т.ч. сальмонеллы в 25 г	не допускаются
	дрожжи, КОЕ/г, не более	5×10^2
	плесени, КОЕ/г, не более	5×10^2
	L. monocytogenes в 25г	не допускаются
- овощи свежие резаные	КМАФАнМ, КОЕ/г, не более	5×10^5
	Enterobacteriaceae, КОЕ/г, не более	1×10^3
	E.coli, в 1 г	не допускаются
	патогенные, в т.ч. сальмонеллы в в 25 г	не допускаются
	дрожжи, КОЕ/г, не более	5×10^2
	плесени, КОЕ/г, не более	5×10^2
L. monocytogenes в 25г	не допускаются	



**Дополнения (проект Изменений № 2)
в Технический регламент Таможенного союза 021/2011
«О безопасности пищевой продукции»,**

включающие требования безопасности по микробиологическим показателям для новой группы пищевой продукции – кулинарных изделий для социального и общественного питания промышленного производства, охлажденных и упакованных в полимерные пленки

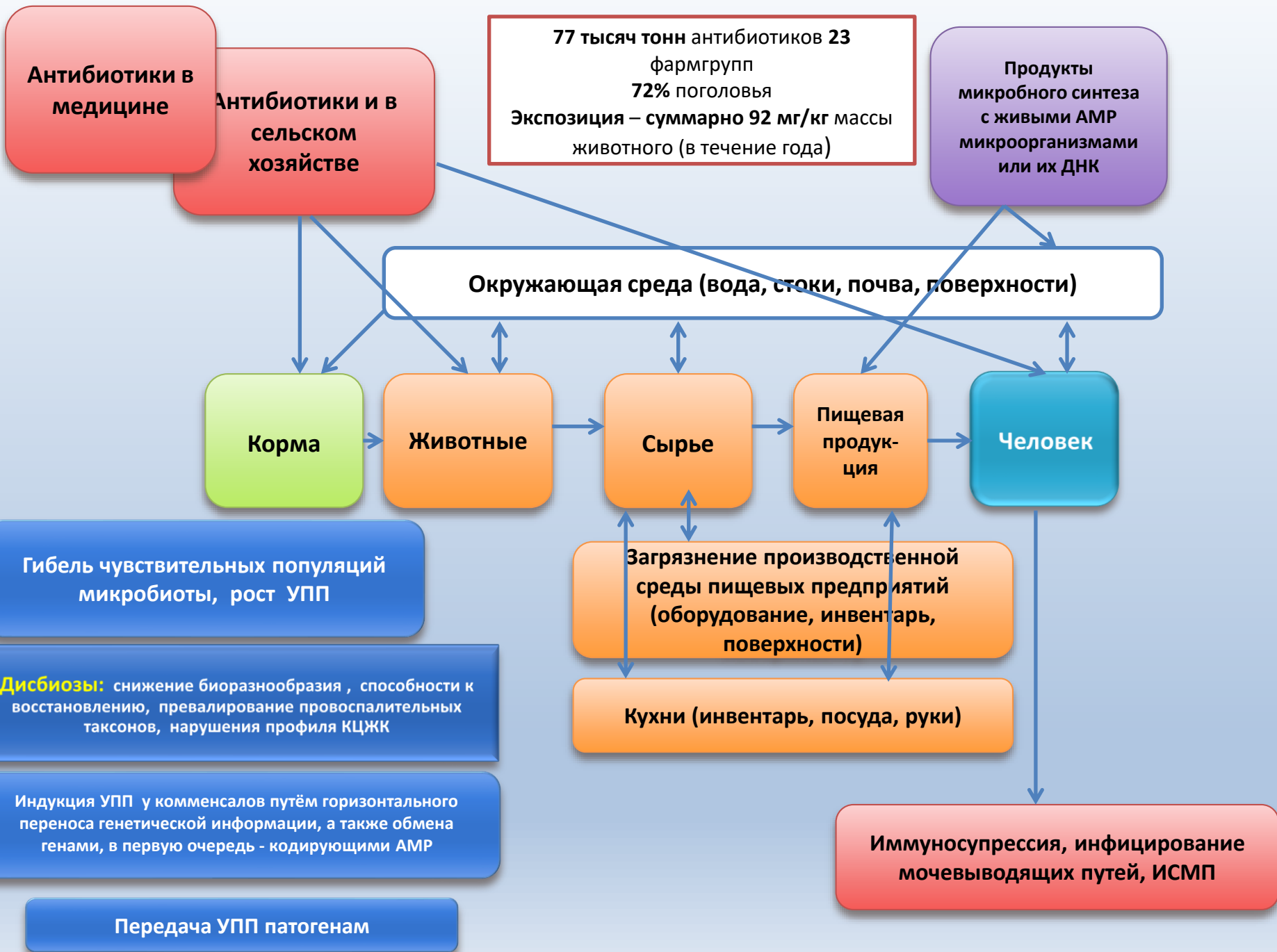
- супы промышленного изготовления охлаждённые, упакованные в полимерные пленки	КМАФАнМ, КОЕ/г	1x10 ³
	БГКП (колиформы) в 1,0г	не допускаются
	S.aureus в 1,0г	не допускаются
	патогенные, в т.ч. сальмонеллы в 25г	не допускаются
	Дрожжи, КОЕ/г, не более	100
блюда из творога, промышленного изготовления охлаждённые, упакованные в полимерные плёнки: запеканки из творога	КМАФАнМ, КОЕ/г	1x10 ³
	БГКП (колиформы) в 1,0г	не допускаются
	S.aureus в 1,0г	не допускаются
	патогенные, в т.ч. сальмонеллы в 25г	не допускаются
	Listeria monocytogenes, в 25 г продукта	не допускаются
	Дрожжи и плесени (в сумме), КОЕ/г, не более	100
блюда из мяса и птицы промышленного изготовления охлаждённые, упакованные в полимерные плёнки	КМАФАнМ, КОЕ/г	1x10 ³
	БГКП (колиформы) в 1,0г	не допускаются
	патогенные, в т.ч. сальмонеллы в 25г	не допускаются
	Listeria monocytogenes, в 25 г	не допускаются
	S.aureus в 1,0г	не допускаются
	сульфитредуцирующие клостридии в 1,0 г	не допускаются



Проект Изменений в ЕСТ ЕАЭС, включающий новые требования микробиологической безопасности для чая, травяных чаёв и напитков

Подраздел 6. «Фруктоовощная продукция - группа 07, группа 08, 09, группа 13, группа 20»		
6.9. Чай (<i>Camellia sinensis</i>), в том числе с добавками	Микробиологические показатели:	
	плесени, КОЕ/г, не более	При анализе 5-ти образцов от партии: 10^4 - в 3 образцах из 5-ти, от 10^4 до 1×10^5 - в 2 образцах
Подраздел 8. «Напитки - группа 22, группа 35»		
8.2.4. Смеси сухого растительного сырья для приготовления горячих безалкогольных напитков, в том числе травяных чаёв	КМАФАнМ, КОЕ/см ³	5×10^5
	БГКП (колиформы) в 1 г	не допускаются
	патогенные, в т.ч. сальмонеллы в 25 г	не допускаются
	дрожжи, КОЕ/г, не более	100
	плесени, КОЕ/г, не более	При анализе 5-ти образцов от партии: 5×10^3 , не более - в 2 образцах из 5-ти, от 5×10^3 до 1×10^5 - в 3 образцах
8.2. Напитки безалкогольные, в том числе с соком и искусственно минерализованные	Микотоксины:	
	патулин	0,05 сокодержущие: яблочный, томатный, облепиховый
	афлатоксин В1	0,005 для смесей сухого растительного сырья для приготовления горячих безалкогольных напитков, в том числе травяных чаёв

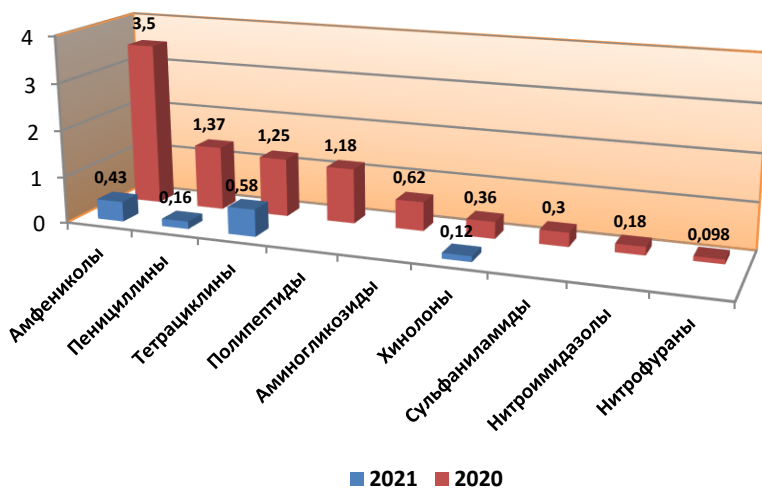
Устойчивость к антимикробным воздействиям и быстрое распространение резистентных штаммов в пищевых продуктах и окружающей среде



Результаты государственного мониторинга остатков антибиотиков в пищевой продукции в РФ

Доля проб пищевой продукции, в которой обнаружены антибиотики (по данным Роспотребнадзора), %

Результат мониторинга	2019	2020	2021
Выше МДУ	0,3	0,23	0,37
Ниже МДУ	10,4	4,55	20,09
Незаявленных	нд	нд	0,05



Государственные доклады «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2020 и 2021 гг.»

Данные мониторинга:

1. Отражают широкое применение антибиотиков в продовольственном секторе
2. Подтверждают множественное присутствие в пище низких доз антибиотиков, способных взаимодействовать с микроорганизмами в самих продуктах и в пищеварительном тракте потребителя



Тетрациклины: индуцируют все механизмы AMP в микробных клетках, активируют трансфер на МГЭ - 1200 генов резистентности, в т.ч. tet M - в геномах всех новых пищевых патогенов и у бактериоидов кишечной микробиоты

Риск-ориентированный подход в выборе объектов интегрированного мониторинга и надзора за антибиотикорезистентностью в пищевой цепи

Перечень ВОЗ критически важных противомикробных препаратов для медицинского применения, 6-й пересмотренный вариант

Консультативная группа по комплексному эпиднадзору за устойчивостью к противомикробным препаратам (AGISAR)
 Ноябрь 2018 г.

Схема классификации и приоритезации противомикробных препаратов, относящихся к категориям «критически важные», «очень важные» и «важные»

Класс противомикробных препаратов	Критерий / Критерий приоритетности (да=*)				
	К1	К2	П1	П2	П3
КРИТИЧЕСКИ ВАЖНЫЕ ПРОТИВОМИКРОБНЫЕ ПРЕПАРАТЫ					
Самые приоритетные					
Цепалоспорины (3-го, 4-го и 5-го поколения)	•	•	•	•	•
Гликопептиды	•	•	•	•	•
Макролиды и кетолиды	•	•	•	•	•
Поллимиксины	•	•	•	•	•
Хинолоны	•	•	•	•	•
Высокоприоритетные					
Аминогликозиды	•	•	•	•	•
Ансамцины (рифамицины)	•	•	•	•	•
Карбапенемы и другие ленымы	•	•	•	•	•
Глицилциклины	•	•	•	•	•
Липопептиды	•	•	•	•	•
Монобактамы	•	•	•	•	•
Оксазолидиноны	•	•	•	•	•
Пенициллины (антипсевдомонадные)	•	•	•	•	•
Пенициллины (аминопенициллины)	•	•	•	•	•
Пенициллины (аминопенициллины, комбинированные с ингибиторами β-лактамаз)	•	•	•	•	•
Производные фосфоновой кислоты	•	•	•	•	•
Лекарственные средства, используемые исключительно для лечения туберкулеза или других заболеваний, вызванных микобактериями	•	•	•	•	•
ОЧЕНЬ ВАЖНЫЕ ПРОТИВОМИКРОБНЫЕ ПРЕПАРАТЫ					
Амфениколы	•	•	•	•	•

Важность изучения АБР к критически важным ПМП, а также комбинированной устойчивости к 2 и более ПМП

Выбор приоритетных видов микроорганизмов, контаминирующих пищевые продукты

Пищевые продукты и сырье животного происхождения

Campylobacter spp., Salmonella spp., Enterococcus spp., E.coli и колиформы, S. aureus и др.

Пищевые продукты	Всего проб	Из них не соответствует нормативам		В т.ч. выделены возбудители сальмонеллеза
		абс.	%	
Всего (55 наименований, включая импорт)	1 085 199	2612	0,24	1516
Птица и птицеводческие продукты	60 084	1297	2,16	1009
Мясо и мясные продукты	111 193	751	0,68	377
Рыба, нерыбные объекты промысла и продукты, вырабатываемые из них	29 704	97	0,33	5
Продукты детского питания	7 989	23	0,29	
Фруктовоовощная продукция	12 535	26	0,21	1
Хлебобулочные изделия	30 464	5	0,02	0
Кондитерские изделия	59 590	26	0,04	18
Кулинарные изделия, в т.ч. продукция предприятий общественного питания	530 710	234	0,04	77
Молоко, молочные продукты	163 975	36	0,02	3

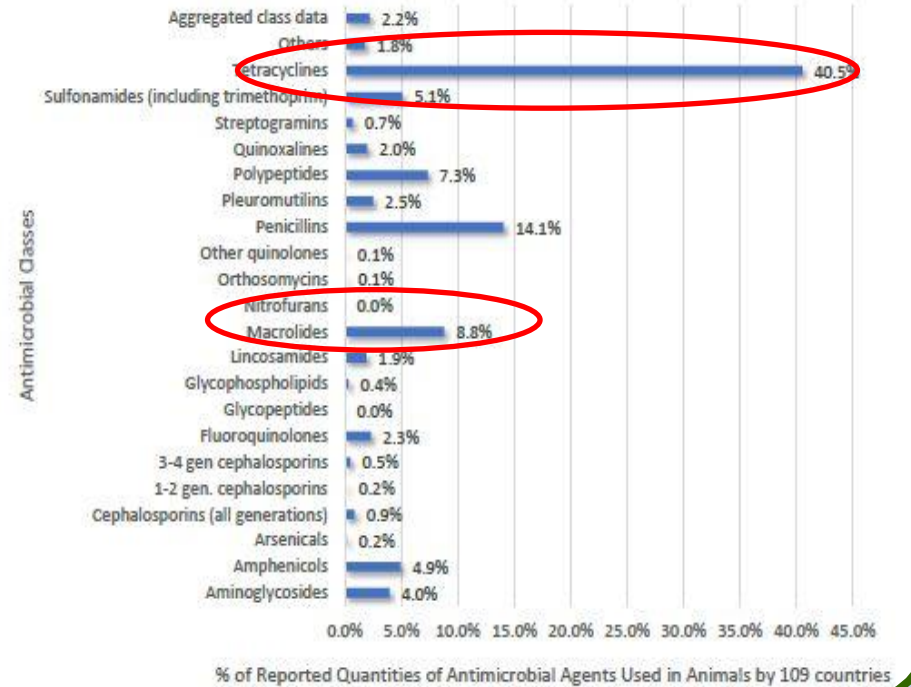
Заболеваемость, обусловленная пищевыми инфекциями



Количество и группы применяемых ПМП в 2016 – 2018 гг., по данным ВОЗЖ (109 стран)

Интенсивность применения антибиотиков в животноводстве коррелирует с распространением антимикробной резистентности у *Campylobacter spp.*

Figure 18. Proportion of antimicrobial classes reported for use in animals by 109 Countries in 2018

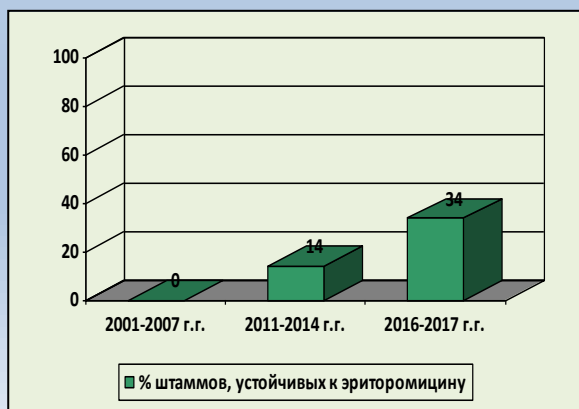


Бактерии рода *Campylobacter*



Рост числа антибиотикорезистентных штаммов *Campylobacter* spp., выделенных из птицепродуктов и производственной среды перерабатывающих предприятий

По данным ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии»



Механизмы антибиотикорезистентности *Campylobacter* spp.

Группы ПМП	Механизмы	Гены резистентности, локализация
Аминогликозиды	Продукция аминогликозид фосфотрансфераз	Гены AphA, плазмидная локализация
Тетрациклины	Энзиматическая инактивация, трансмембранная помпа (efflux pump), изменения структуры рибосом	Гены tet(O), локализованные на плазидах (67-70% штаммов) или в хромосоме (33%), а также на других мобильных элементах
Фторхинолоны	Мутации субъединицы А ДНК гиразы	GyrA, хромосомная
Макролиды	Модификация мишени, efflux pump	Метилирование или мутации участков 23S рибосомальной РНК, ген ДНК- метилазы erm (B), хромосомная и плазмидная локализация

Механизмы формирования антибиотикорезистентности *Campylobacter* spp.

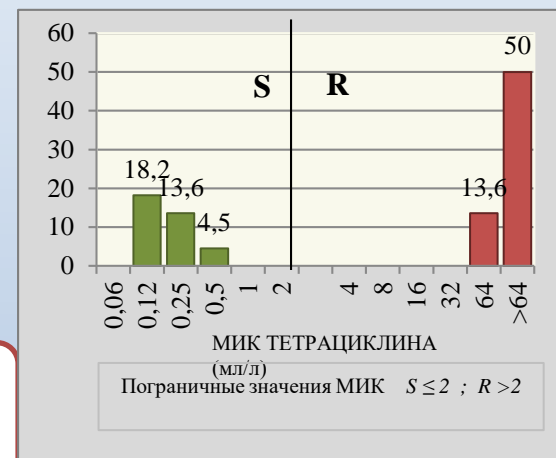
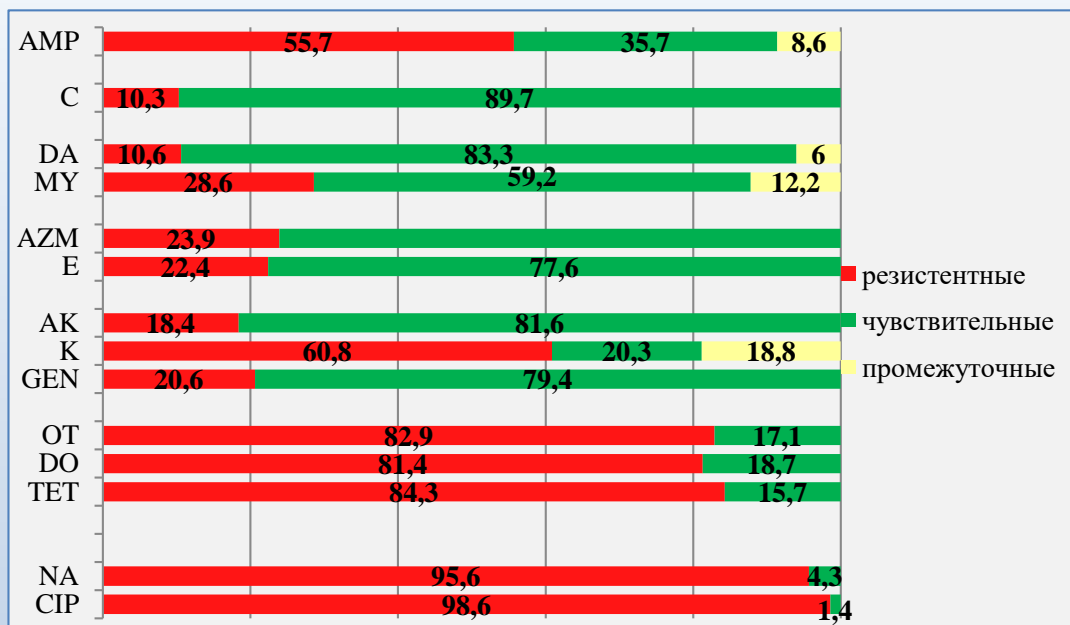


плазмидный или транспозонный варианты передачи резистентности;

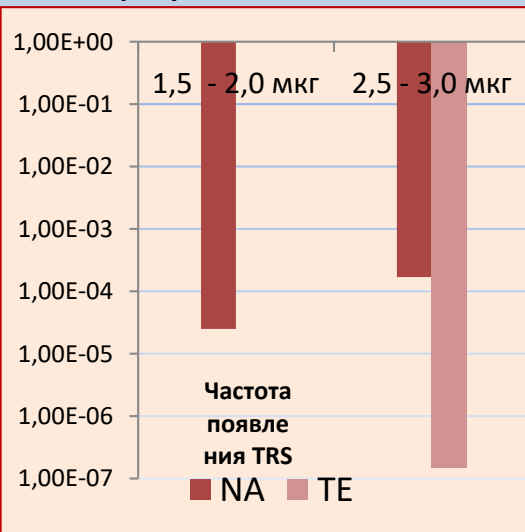
хромосомный тип передачи резистентности.

природная трансформация генома бактерий *Campylobacter* (интергеномная рекомбинация)

Частота обнаружения антибиотикорезистентных штаммов *S.jejuni*, выделенных из птицепродуктов и объектов окружающей среды



Трансформация *S.jejuni* в присутствии антибиотиков



66 % штаммов *S.jejuni* обладали мультирезистентностью к 3 - 7 антибиотикам различных групп, в том числе 40% - к 4 и более антибиотикам.; 3 % - полирезистентные штаммы, устойчивые к 6 - 8 группам ПМП.



Систематический мониторинг устойчивости к ПМП циркулирующих в пищевой цепи штаммов *Campylobacter* spp. для разработки и принятия эффективных мер, направленных на снижение резистентности



Разработка интегрированных методических подходов к контролю возбудителей кампилобактериоза в пищевой продукции

Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Методы ускоренного определения бактерий рода *Campylobacter* в пищевой продукции и оценка их антибиотикорезистентности

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ
МУК 4.2.3545-18**

Издание официальное

Москва 2018

МУК 4.2.3545-18 содержат :

- Ускоренные методы детекции и количественного учета термофильных кампилобактеров на основе комбинирования бактериологического и молекулярно-генетического анализа
- Порядок санитарного обследования предприятий в контрольных критических точках производства
- Рекомендации по оценке эффективности санитарной обработки оборудования и инвентаря
- **Методы определения антибиотикочувствительности штаммов *Campylobacter* spp., выделенных из пищевых продуктов и объектов производственной среды**

Разработчик - ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии»

Задачи: организация в России интегрированной системы мониторинга возбудителей инфекций от пищи в России

Мониторинг изолятов из пищевых продуктов и смывов на производстве при проведении надзора за эпидзначимыми объектами -

лабораторная служба Роспотребнадзора - более 1 млн. проб в год

Мониторинг клинических изолятов

– лабораторная служба и эпидемиологи медицинских организаций, эпидемиологические отделы Роспотребнадзора

Научные исследования

- научные организации Роспотребнадзора, Минздрава России, РАН, ряд отраслевых

НИИ

- **Мониторинг АМР в референс-центре по антибиотикам и АМР**

Ветеринарный мониторинг микроорганизмов, выделенных от больных и павших животных

– Россельхознадзор, ветеринарные лаборатории в субъектах РФ

Задачи и перспективы развития методической базы контроля пищевой продукции

Культуральные методы

Референс - методы

ГОСТ и ГОСТ Р, гармонизированные с текущими версиями ИСО

- 2015 - пробоподготовка 0%, методы – 32%

- 2023 – 67% и 67%, соответственно, из них со статусом IDT – 100% и 78% (MOD – 0 % и 22%)

Актуализированы в 2022:

- *L.monocytogenes* и *Listeria sp.* (IDT ISO 11290-1-2022) взамен ГОСТ 32031-2012,

- *Salmonella sp.* (MOD к ISO 6579-1:2017/1:2020) взамен ГОСТ 31659-12,

- *Cronobacter (E. sakazakii)* (IDT к ISO 22964:2017) взамен ГОСТ ISO/TS 22964-2013

Задачи:

■ Разработка и стандартизация методов выявления и подсчёта микроорганизмов на хромогенных средах, включая тесты на подложках

■ Приборная автоматизация определения количества микроорганизмов

Молекулярно-биологические методы

Альтернативные методы

Прямая диагностика патогенов и их токсинов в продукте, идентификация изолятов из пищи на основе:

- Иммуноанализа (ИФА)
- ДНК-анализа (разные форматы ПЦР и гибридизации НК)

Внедряются менее интенсивно:

- приборная детекция
- зависимость от импорта
- требуют валидации!
- сложная пробоподготовка!

Утверждены как МУК, МУ и МР, реже ГОСТ или пункты в ГОСТ:

■ ГОСТ ISO/TS 13136, ГОСТ Р 57989

■ МР 02.031-08, 02.032-08, 02.036-08, МУК: 4.2.1122-02, 4.2.1955-05, 4.2.2428-08, 4.2.2429-08, 4.2.2788-10, 4.2.2872-2011, 4.2.2878–11, 4.2.2879-11, 4.2.2884-11, 4.2.2963-11, 4.2.3144-13, 4.2.3261-15, 4.2.3262-15, 4.3.3545-18, 4.2.3591-19.

Полученные преимущества:

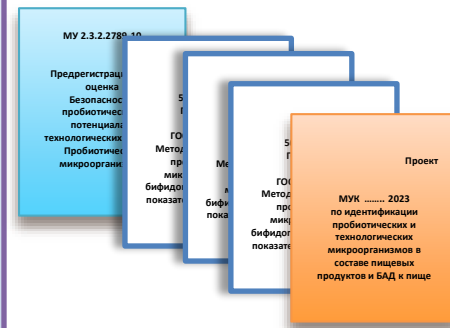
- ускорение результатов
- высокая специфичность
- анализ трудно культивируемых микробов

Задачи по разработке ГОСТ на:

■ ИФА СЭТ и др. бактериальных токсинов, на базе отечественных систем

■ экспресс-методы комплексного выявления патогенов различной природы

Методы оценки пробиотических и молочнокислых микроорганизмов – 10 ГОСТ и МУ



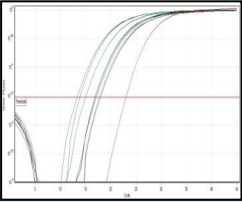
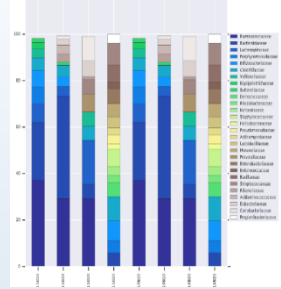
Задачи:

- Доработка в 2023 МУК по ПЦР идентификации пробиотических микроорганизмов в смешанных продуктах
- Разработка Изменений в МУ 2.3.2.2789-10 о порядке регистрации штаммов - пробиотиков

Проблемы импортозамещения

- Необходимо расширение ассортимента промышленно выпускаемых отечественных тест-систем, питательных сред и приборной базы
- Разработка соответствующих национальных и межгосударственных стандартов, а также МУК и МР

Задачи: внедрение современных методов анализа возбудителей в систему контроля микробиологической безопасности пищевой продукции



Традиционные методы ПЦР-анализа

ДНК-методы, используемые для анализа пищевых продуктов

ДНК-гибридизация	Полимеразная цепная реакция
Флуоресцентная гибридизация <i>in situ</i> (FISH)	Традиционная ПЦР
блот-гибридизация ДНК	ПЦР с обратной транскрипцией
гибридизация на ДНК-чипах	Мультиплексная ПЦР
	Гнездовая (Nested) ПЦР
Изотермальная амплификация	Real-time ПЦР
LAMP	С флуоресцентными системами: SYBR Green
NASBA	TaqMan Probes
RSA, SDA	FRET probes
	Molecular Beacons
	Количественная Rti-ПЦР



- ❑ Генотипирование изолятов из пищевых продуктов, смывов, от персонала, пострадавших и контактных
- ❑ Установление эпидемиологических связей и подтверждение источников инфекций
- ❑ Мониторинг антимикробной устойчивости
 - ❑ Анализ структуры природных биоценозов – резервуаров новых патогенов
 - ❑ Верификация систем менеджмента качества
 - ❑ Базы данных по циркулирующим возбудителям инфекций с пищевым путём передачи
- ❑ Системы раннего оповещения о вспышках, возникающих новых патогенах, актах биотерроризма

Совершенствование системы микробиологического нормирования

Совершенствование превентивного подхода профилактики инфекций от пищи

L.monocytogenes : геномные методы для оценки микробиологического риска

РФ

В среднем ежегодно заболевших около **50 чел** (в Москве ~ **18 чел** – 35%)

Тяжёлые формы – 81%

Летальность – 13-19%

Пищевой путь - в **47%** сл.

Данных о происхождении виновных продуктов не обнаружено

ЕС и США число заболевших ежегодно: более **2500** и **1600** чел., соответственно

Продукты-факторы передачи (по хронологии):

- Мягкие сыры, молоко питьевое, масло сливочное
- Рыба копчёная
- Мороженое
- Мясные деликатесы
- Фрукты и овощи нарезанные
- Овощи замороженные
- Грибы
- Кондитерские изделия со сливками

Подтверждения связи с пищевым источником - метод WGS. Наиболее часто подтверждаемый сиквенс-тип **ST6**

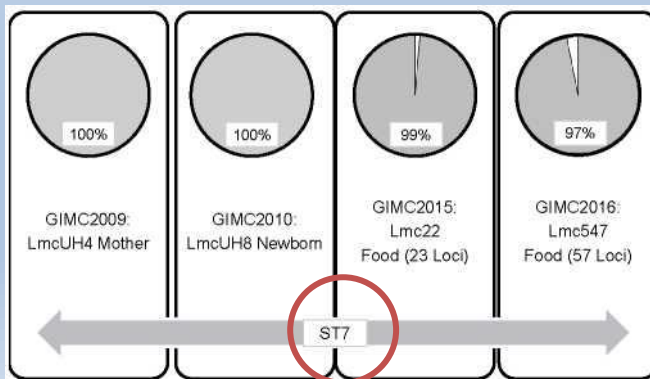
Скрининг распространённости *L.monocytogenes* и наблюдение за персистирующими генотипами проводится на базе ЦНИЭМ им. Гамалеи, ГНЦ ПМБ и ЦНИИЭ Роспотребнадзора

На 2022 г. в *Listeria Pasteur* MLST database (<https://bigsdbs.pasteur.fr/>) внесены данные о 221 изоляте из России

2020-2022 – данные о молекулярно-генетических характеристиках агентов спорадического инвазивного листериоза в Москве и генетическом разнообразии листерий на 2-х мясоперерабатывающих производствах (Воронина О.Л., Тартаковский И.С. и др.)

Методы: секвенирование MLST и MvLST локусов вирулентности для определения сиквенс-типа и профиля интерналинов
Выборочно - WGS

ST6 лидировал в клинических штаммах и не найден в пище



Аллельный профиль ST8 - 44%, ST321 – 6% - подтверждались ранее, как возбудители не в РФ
ST121 – 25%, ST2330 (ST9) – 6% - нет в базе

Задача – налаживание координации и дальнейшее развитие WGS

Пищевая продукция и пищевые ингредиенты, производимые с использованием микроорганизмов - продуцентов (ГММ и не-ГММ)



- ❑ Все виды заквасочных, стартовых и пробиотических культур подвержены трансдукции, конъюгации генов AMP, что опасно для микробиоты ЖКТ
- ❑ *Enterococcus* spp. как факторы наибольшего риска запрещены в составе БАД и специализированных продуктов в РФ и ЕАЭС

Порядок и методы контроля резистентности - МУ 2.3.2.2789-10
«Методические указания по санитарно-эпидемиологической оценке безопасности и функционального потенциала пробиотических микроорганизмов, используемых для производства пищевых продуктов».
Цель - не допустить штаммов, имеющих трансмиссивную AMP

Мониторинг на российском рынке продуктов, полученных с применением ГММ и аналогов - МГМА: в 2004–2015 гг. исследовано 1650 проб. Маркеры трансмиссивной резистентности обнаружены в **3%** проб. На рынок эти продукты не допущены.
С 2015 г. ГММ и МГМА не подлежат государственной регистрации

Пищевые ингредиенты нового вида: «олигосахариды грудного молока» микробного происхождения (ГММ)

2'-фукозиллактоза,
дифукозиллактоза
Лакто-N-тетраоза и др.



Заменители ОГМ -
необходимый компонент
адаптированных молочных
смесей для питания детей
раннего возраста

Алгоритм оценки безопасности:

1. Оценка безопасности и
государственная регистрация
ГМ-штамма – продуцента

2. Санитарно-
эпидемиологическая экспертиза
и государственная регистрация
ОГМ как пищевого ингредиента
нового вида

3. Санитарно-эпидемиологическая
экспертиза и государственная
регистрация адаптированных
молочных смесей, содержащих ОГМ
микробного происхождения

• Стимулирующее действие
на формирование нормального кишечного
микробиома детей раннего возраста
• Иммунорегулирующее действие

• Роль в формировании защитного кишечного
барьера
• Ингибирование инфицирования патогенами

• Замена традиционно используемых видов
пребиотиков (галактоолигосахаридов,
фруктоолигосахаридов, инулина)

С 2019 г. ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии» на постоянной основе проводит комплексную санитарно-эпидемиологическую оценку безопасности для целей государственной регистрации ГМ-штаммов – продуцентов олигосахаридов, ферментных препаратов, витаминов, нуклеотидов, кофермента Q10 и других пищевых ингредиентов микробного синтеза

Система оценки безопасности ГММ: законодательная, нормативная и методическая база

5 июля 1996 года

№ 86-ФЗ

**ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ЗАКОН
«О ГОСУДАРСТВЕННОМ РЕГУЛИРОВАНИИ
В ОБЛАСТИ
ГЕННО-ИНЖЕНЕРНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ»**

**Технический регламент Таможенного союза ТР ТС
021/2011
“О безопасности пищевой продукции”**

**Технический регламент Таможенного союза
ТР ТС 022/2011
“Пищевая продукция в части ее маркировки”**

Разработана система оценки безопасности при допуске ГММ на продовольственный рынок и в пищевую промышленность, контроля их в обороте, а также требования к маркировке ГММ-продуктов.

Методическое обеспечение контроля позволяет проводить скрининг нескольких маркеров модификаций и количественный анализ содержания ДНК ГММ

**ПРАВИТЕЛЬСТВО РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ПОСТАНОВЛЕНИЕ от 23 сентября 2013 г. № 839
О государственной регистрации
генно-инженерно-модифицированных
организмов, предназначенных
для выпуска в окружающую среду,
а также продукции,
полученной с применением таких организмов
или содержащей такие организмы**

Государственная система санитарно-эпидемиологического нормирования Российской Федерации

Определение генетически модифицированных микроорганизмов и микроорганизмов, имеющих генетически модифицированные аналоги, в пищевых продуктах методами полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени и ПЦР с электрофоретической детекцией
**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ
МУК 4.2.2305 – 07.**

Издание официальное
Москва

2007

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ.
БИОЛОГИЧЕСКИЕ И
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ.

Методические указания по санитарно-эпидемиологической оценке безопасности и функционального потенциала пробиотических микроорганизмов, используемых для производства пищевых продуктов

**Методические указания
МУ 2.3.2.2789-10**

Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации

2.3.2. ПИЩЕВЫЕ ПРОДУКТЫ И ДОБАВКИ

Микробиологическая и генетическая оценка безопасности пищевой продукции, полученной с использованием генно-инженерно-модифицированных микроорганизмов

**Методические указания
МУК 2.3.2.1830-04.**

Издание официальное

Минздрав России
Москва
2003

Новые риски в биотехнологии



Задачи: Актуализация методологии предрегистрационной оценки безопасности ГММ - разработка методов контроля, адекватных современным технологиям конструирования ГММ на основе безамплификационных технологий и репортёрной ДНК. Совершенствование методов идентификации и количественного анализа ГММ

СЕГОДНЯ: методы секвенирования микроорганизмов в
БИОТЕХНОЛОГИИ

для оценки безопасности и подлинности пищевой продукции
микробного синтеза и ГММ-продукентов



NGS-секвенирование

Полногеномное
секвенирование
отдельных геномов микроорганизмов

Метагеномное
секвенирование
микробных сообществ

Метатаксономиче
ская
идентификация

Конструирование новых
штаммов, генная инженерия

Поиск новых штаммов в природных биоценозах
Анализ вариабельности геномов

Оценка безопасности ГММ-продукентов

Наличие генов патогенности и антибиотикорезистентности;
поиск генетических вариаций, оценка стабильности конструкций,
характеристика целевых функциональных генов



NGS-секвенирование:
более 50% исследований
в мире сегодня проводятся
в биотехнологии;

40% - секвенирование патогенных
бактерий; 2% - изучение редких и
малоизвестных микроорганизмов

Разработка методов контроля микробных продуцентов и пищевой продукции, изготовленной с их использованием (ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии»)

Алгоритм генотипирования микромицетов филума *Ascomycota*:

Выполнение требования ТР ТС 029/2012 к отсутствию в продукте жизнеспособных клеток продуцентов ферментных препаратов микробного происхождения –

Разработка унифицированных методов таксономической и штаммоспецифической идентификации микробных продуцентов, основанных на различных форматах секвенирования и ПЦР-анализа

Обнаружение маркеров генных модификаций в ферментных препаратах, заквасках, БАД к пище

Совершенствование технологий очистки целевых продуктов микробного синтеза от биомассы продуцента

Экстракция тотальной ДНК и её очистка;

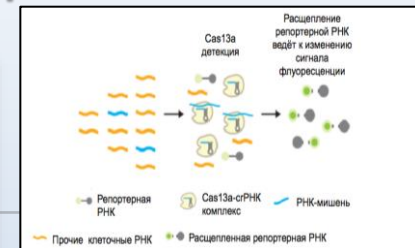
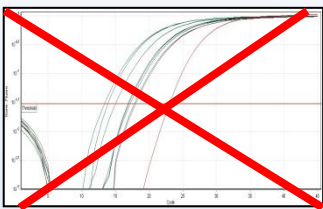
Аmplification с панелью праймеров, кодирующих консервативный ITS-регион, β-тубулин II (TUB2), ДНК-управляемую РНК-полимеразу II (субъединицы А (RPB1) и В (RPB2)), трансляционный фактор элонгации 1α (TEF1) и гены токсигенности;

Секвенирование по Сэнгеру;

Биоинформационный сравнительный анализ полученных результатов в сопоставлении с референсными геномами

Результат ПЦР-идентификации	Результат секвенирования по Сэнгеру (% идентичности)		
	Длина прочтения, п.о.	Результат идентификации с использованием алгоритма BLAST и баз данных GenBank	
		Refseq genome database	Nucleotide collection (nt)
<i>Aspergillus niger / tubingensis</i>	572	<i>Aspergillus niger</i> (99,82%)	<i>Aspergillus niger</i> (99,82%)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	569	<i>Aspergillus fumigatus</i> (99,64%)	<i>Aspergillus fumigatus</i> (99,64%)
<i>Aspergillus spp.</i>	562	<i>Aspergillus steynii</i> (97,34%)	<i>Aspergillus westerdijkiae</i> (99,43%)
<i>Aspergillus spp.</i>	563	<i>Aspergillus steynii</i> (96,95%)	<i>Aspergillus westerdijkiae</i> (100,00%)
<i>Aspergillus spp.</i>	535	<i>Aspergillus steynii</i> (97,32%)	<i>Aspergillus westerdijkiae</i> (99,80% %)

Завтра: новые методологии в системе обеспечения микробиологической безопасности пищи



Безамплификационные и микрочиповые аналитические системы; автоматизированные платформы «биологического литья»

Массивный интеллектуальный анализ данных omics с помощью искусственного интеллекта

Преодоление антибиотикорезистентности пищевых патогенов

Редактирование геномов (молекулярные ножницы и др. инструменты): создание новых штаммов ГММ и их индикация

Матричные ДНК-биочипы: экспресс-индикация бактериальных и вирусных патогенов в пищевых матрицах, анализ генома и транскриптома возбудителей

Синтетические платформы для биомоделирования рациональной эволюции геномов, проектирование «каркасных клеток»

Анализ генов, ассоциированных с резистентностью и патогенностью у потенциальных возбудителей (пищевых, нозокомиальных, оппортунистических инфекций)

Разработка комбинаций высоковирулентных линий бактериофагов (мультифаговые коктейли)





Место проведения: г.Москва,
площадь Европы, 2, Рэдиссон
Славянская)

**XVIII Всероссийский конгресс
нутрициологов и диетологов с международным участием, посвященный
300-летию Российской академии наук
«Нутрициология и диетология для здоровьесбережения населения
России» 13-14 ноября 2023 г., Москва**

www.congression.ru

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации

Российская академия наук

Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Министерство здравоохранения Российской Федерации

Российский научный фонд

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи

Общероссийская общественная организация «Российский союз нутрициологов, диетологов и специалистов пищевой индустрии»

Питание и здоровье: оптимизация, инновации, обеспечение качества и безопасности пищи

Глобальные вызовы и новые риски в обеспечении безопасности пищи

***Благодарю
за внимание!***