

## Bir gıda patojeni: *Cronobacter sakazakii*

Aylin KASIMOĞLU DOĞRU

Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Kırıkkale, Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 16.02.2010, Kabul Tarihi / Accepted: 16.06.2010

**Özet:** *Cronobacter sakazakii*, yeni doğanlarda menenjit, sepsisemi ve enterokolite neden olan fırsatçı bir patojendir. Etken, *Enterobacteriaceae* familyasında yer alan, Gram-negatif çubuk şeklinde bir bakteridir. *C. sakazakii* farklı kaynaklardan izole edilmesine rağmen, enfeksiyonlar toz bebek mamalarıyla ilişkilendirilmiştir. *C. sakazakii* enfeksiyonlarından korunabilmek için, etkenin üreme, canlı kalma, inaktivasyon koşulları gibi özellikleri ile izolasyon ve identifikasyon yöntemlerinin bilinmesi önemlidir.

**Anahtar sözcükler:** *Cronobacter sakazakii*, gıda, yeni doğan.

### A food pathogen: *Cronobacter sakazakii*

**Summary:** *Cronobacter sakazakii* is an opportunistic pathogen causing meningitis, septicemia and enterocolitis in neonates. The organism is a Gram-negative rod within the family *Enterobacteriaceae*. Although the pathogen was isolated from different sources, its infections have been linked with powdered infant formulas. It is important to know growth, survival, and inactivation conditions of *C. sakazakii* and its isolation and identification methods for preventative purposes.

**Key words:** *Cronobacter sakazakii*, food, infant.

### Giriş

*Cronobacter sakazakii*, yeni doğan enfeksiyonları ile ilişkilendirilen fırsatçı bir patojendir (22). Adını Japon mikrobiyolog Riichi Sakazaki'den alan etken, koliform, basillus, sarı koliform, sarı enterobakter, pigmentli kloacal A organizması, sarı pigmentli *Enterobacter cloaca* ve *Enterobacter sakazakii* olarak farklı adlarla anılmıştır (13). Iversen ve ark. (17)'nin *E. sakazakii*'ye ait biyogrupların *Cronobacter* genusu ile taksonomik ilişkisini ortaya koyması ile yeniden klasifikasyon yapılmıştır (17). Etkenin, suşa bağlı olarak enterotoksin benzeri bileşikler üretebildiği ve sitotoksik etkilerinin olduğu belirlenmiştir (23). *C. sakazakii* enfeksiyonunda yeni doğan mortalitesinin %40-80 arasında olması ve toz bebek mamalarında çok düşük düzeydeki etkenin (1000 bakteri) hastalığın oluşumu için yeterli bulunması ile tüm dünya ülkelerini ilgilendiren bir sorun olarak görülmektedir (15, 22). Yeni doğan enfeksiyonlarının toz bebek mamalarıyla ilişkilendirilmesi nedeniyle (22), pek çok ülkede olduğu gibi Türkiye'de de bebek mamalarının mikrobiyolojik kriterlerine yönelik değişiklik yapılarak, Türk Gıda Mevzuatı Devam Formülleri Tebliği'nde bebek

mamalarının 25 gramında *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter sakazakii*) bulunmaması gerektiği belirtilmiştir (2).

Bu derlemede, önemli gıda patojenleri arasında yer almaya aday olarak görülen *C. sakazakii*'ye ilişkin çeşitli bilgilere yer verilerek, etkenin tanıtılması amaçlanmıştır.

### Biyokimyasal Özellikleri

*Enterobacteriaceae* familyasında yer alan *C. sakazakii*, fakültatif anaerobik, peritrik flagellaya sahip, hareketli, Gram-negatif, sporsuz, çubuk şeklinde bir bakteridir. Etken nitratı indirgeme, karbon kaynağı olarak sitratı kullanma, eskülini ve arjinini hidrolize etme, L-ornitini dekarboksile etme, D-glukoz, D-sukroz, D-rafinoz, D-melibiyoz, D-sellobiyoz, D-mannitol, D-mannoz, L-ramnoz, L-arabinoz, D-trehaloz, galakturonat ve D-maltozdan asit oluşturma özelliklerine sahiptir. Voges-Proskauer testini, metil red testini ve oksidaz testi negatif vermektedir. Optimal pigment oluşturma sıcaklığı 25°C'dir (10, 17).

## Üreme ve Canlı Kalma Koşulları

*C. sakazakii*, *Enterobacteriaceae* familyasının diğer üyelerine oranla sıcaklığa daha dayanıklı bir bakteridir. Üreyebildiği sıcaklık aralığı 5.5-47°C olup (optimal üreme sıcaklığı 37-43°C), düşük sıcaklığa dayanıklı olduğu belirlenmiştir (4°C) (16, 22). Desimal reduksiyon zamanı (D-değeri) 60°C'de ( $D_{60°C}$ ) toz bebek mamasında 3.52-3.58 dakika, kahverengi pirinçte 3.79-3.6 dakika, sıvı besi yerinde  $D_{58°C}$  0.39-0.60 dakika, Z değeri ise 3.1-3.6°C olarak belirlenmiş olup, bazı suşların daha yüksek termotolerans gösterdikleri ( $D_{58°C}$  9.9 dakika) bildirilmiştir (6, 9).

*C. sakazakii* hücre içerisinde trehaloz birikimi ile düşük su aktivitesi değerlerine ( $a_w$  0.25-0.30) ve ozmotik strese dirençli olduğu belirlenmiştir. Toz bebek mamalarında 4°C'de 12 aydan daha uzun süre canlı kalabilmektedir (5, 6, 21).

Etkenin üreyebildiği en düşük pH değerlerinin 24-37°C'ler arasında pH 3.9-4.1 olduğu bildirilmiştir (8).

## Risk Grubu Bireyler

Enfeksiyonun yüksek risk grubunda yeni doğanlar, immunsupresif bireyler ve yaşlılar yer almaktadır. Prematüre bebeklerde gastrointestinal sistemin daha geçirgen olması, hem prematüre hem de matür yeni doğanlarda patojenlere karşı koruyan doğal bağırsak florasının olmaması (14) ve mide asiditesinin düşük olması predispoze faktörlerdir (11).

## Minimal İnfektif Doz

*C. sakazakii*'nin minimal infektif dozuna ilişkin epidemiyolojik bilgi olmaması nedeniyle *Neisseria meningitidis*, *Escherichia coli* O157:H7 ve *Listeria monocytogenes* 4b gibi patojenlerle aynı infektif doz (1000 bakteri hücresi) kabul edilmektedir. Bu dozun etkenin karşılaştığı stres faktörlerine, bireysel duyarlılığa ve gıdanın bileşimine göre değişebileceği vurgulanmaktadır (15). *C. sakazakii*'nin oda sıcaklığında bir gecede, 7 logaritmadan fazla üreyebilmesi (22) ve yeni doğan farelere oral ve intraperitoneal yolla verilen etkenin letal dozunun suşa göre 105-108 kob arasında değiştiğinin belirlenmesi (23), bebek mamalarının üretim ve hazırlanma aşamalarında kontaminasyonların önlenmesinin ve tüketime hazır mamaların saklama koşullarının önemini ortaya koymaktadır.

## *C. sakazakii*'nin Neden Olduğu Enfeksiyonlar

*C. sakazakii*, yeni doğanlarda yüksek mortalite ve morbidite ile seyretmesi ve bebeklerin gıda zincirinde ciddi mikrobiyolojik tehlike oluşturması nedeniyle, adını Yunan mitolojisinde çocuklarını doğar doğmaz öldüren tanrı olarak bilinen Cronos'tan alan *Cronobacter* genusunun karakteristik bir üyesidir (17). *C. sakazakii* enfeksiyonları, yeni doğanlarda menenjit, septisemi ve nekrotik enterokolitis ile önemli ölçüde hayati tehlike oluşturmaktadır. Prematüre ve düşük doğum ağırlığına sahip yeni doğanlarda, özellikle ilk 28 günde enfeksiyon riski daha fazladır. Klinik semptomları yeni doğanlarda ventrikülitis, beyin apseleri, serebral infarkt ve kist oluşumu ile komplike menenjit, bakteriyemi ve nekrotik enterokolitisi kapsar. Bu semptomlara ateş, hipotermi, bradikardi, iştah azalması, irritabilite, siyanoz, kollaps ve konvülsiyonlar eşlik edebilmektedir. Yetişkinlerde *C. sakazakii* enfeksiyonları sık görülmemekte ve hayati tehlike oluşturmamaktadır. Etken, diyabet hastalarında ayakta görülen ülseratif yaralardan izole edilmiştir. Yaşlılarda ise, *C. sakazakii* enfeksiyonlarında ürosepsis, pnömoni ve bakteriyemi şekillendiği bildirilmektedir (13, 22).

## Gıdalarda Bulunuşu

*C. sakazakii*, insan ve hayvan bağırsağının normal florasında bulunmaması nedeniyle, gıdaların primer kontaminasyon kaynaklarının toprak ve su olduğu ifade edilmektedir (15). Pastörizasyon işlemi ile inaktive olduğu bilinen etkenin, açılmamış mama kutularından izole edilmesi (22), toz bebek mamalarının pastörizasyon sonrası aşamada vitamin ve mineraller gibi sıcaklığa duyarlı katkıların eklenmesi esnasında kontamine olabileceği görüşünü kuvvetlendirmiştir (5). Toz bebek mamalarındaki *C. sakazakii* düzeyinin oldukça düşük olduğu (0.36 kob/100g) (22). Son yıllarda yoğunlaşan çalışmalar, bebek mamalarının yanı sıra deve eti, domuz eti, kanatlı eti, et ürünleri, su ürünleri, yumurta, süt, hububat, bisküvi, pastacılık ürünleri, sebze ve salata gibi çeşitli gıdalarda *C. sakazakii* varlığını göstermiş (5, 16) olmakla birlikte yetersizdir.

## İnaktivasyon

*C. sakazakii*'nin HTST (High Temperature Short Time: Yüksek Sıcaklık Kısa Zaman) pastörizasyon yönteminde 71.7°C'de 15 saniyede inaktive olduğu bildirilmiştir (22). Bebek mamalarına 10 µg/ml

laktoperoksidaz uygulamasının *C. sakazakii* üzerine hem inaktive edici hem de üremeyi önleyici yönde etkileri olduğu saptanmıştır (5). Yapılan deneysel bir çalışmada, 10 µg/ml klordioksitin elma yüzeyindeki etkende, 1-5 dakikada 3.38-3.77 log kob/elma düzeyinde azalma sağlarken, 40 µg/ml Tsunami 200'ün  $\geq 4.00$  log kob/elma düzeyinde azalmaya neden olduğu belirlenmiştir. Klorun kıvrıcık yapraklarındaki *C. sakazakii*'nin inaktivasyonunda, elma ve domatesteki uygulamalara oranla daha az etkili olduğu, Tsunami 200 (40-80 µg/ml)'ün kıvrıcık yapraklarındaki etken üzerinde 5 dakikada  $\geq 5.31$  logaritmalık azalma sağladığı bildirilmiştir (18). Gama irradasyon işleminin ise 5 kGy dozda, 8.0-9.0 log kob/g düzeydeki *C. sakazakii*'yi tamamen elimine ettiği ve gama irradasyon uygulanan toz mamalarda sulandırılmalarını takiben, 10°C'de 6 saat boyunca etkenin tekrar üremediği bildirilmiştir (19). FAO (Food and Agriculture Organisation) tarafından güvenli olarak kabul edilen ve tarçın kabuğundan elde edilen trans-cinnamaldehyde ile yapılan denemelerde, %0.5'lik konsantrasyonun 6 log kob/ml *C. sakazakii*'yi 23°C ve 37°C'de 4 saatte, 4°C ve 8°C'de 10 saatte inaktive ettiği, fakat trans-cinnamaldehyde'in gıdalarda duyuşal değişikliklere neden olup olmadığının araştırılması gerektiği ifade edilmiştir (1). Propiyonik asit ve asetik asit gibi organik asitlerin ise *C. sakazakii*'nin inaktivasyonunda etkili olduğu ve koruyucu amaçla sıvı gıdalarda kullanılabilceği rapor edilmiştir (3).

### İzolasyon ve İdentifikasyon

Gıdalarda düşük düzeyde bulunan etkenin izolasyon oranını arttırmak amacıyla ön zenginleştirme ve selektif zenginleştirme uygulanmaktadır. En Muhtemel Sayı Teknięi'ne dayanan FDA (Food and Drug Administration: Amerika Gıda ve İlaç Dairesi) metoduna göre; zenginleştirme aşamasında *Enterobacteriaceae* enrichment (EE) brot, katı besi yeri olarak Violet Red Bile Glukoz (VRBG) agar, sarı pigment oluşumunu görebilmek için Trypticase Soya Agar (TSA) kullanılır. TSA'da oluşan sarı renkli kolonilere oksidaz ve diğer biyokimyasal identifikasyon testleri uygulanır (12).

Kromojenik agar kullanılarak yapılan kültür metoduna göre; 25 gr örnek 225 ml ön zenginleştirme sıvısı (10 µg vankomisin hidroklorid içeren tamponlanmış peptonlu su) ile homojenize edilerek 37°C'de 18±2 saat inkübe edilir. Bir mililitre ön

zenginleştirme süspansiyonu selektif zenginleştirme besi yerlerine inokule edilir. İnkübasyon periyodu sonunda 10'ar µl selektif zenginleştirme süspansiyonu, *Enterobacter sakazakii* isolation agar (ESIA; 44°C 21±3 saat R&F® *Enterobacter sakazakii* Chromogenic Plating Medium (ESPM; 37°C 24 saat) ve *Druggan-Forsythe-Iversen* Medium (DFI; 37°C 24 saat) gibi kromojenik agarlara geçilir. İnkübasyon periyodu sonunda oluşan şüpheli koloniler (ESIA: mavi, ESPM: siyah, DFI: yeşil), koyun kanlı agara geçilir ve burada oluşan koloniler, ID 32E test veya API 20E test sistemleri ile test edilmelerini takiben PCR ile doğrulanır (4, 7, 16). Seo ve Brackett (24) real-time PCR ile *C. sakazakii*'nin makromoleküler operon sentezini hedefleyen primerler ve TaqMan prob kullanarak, sulandırılmış bebek mamalarında zenginleştirme uygulanmadan 100 kob/ml düzeyinde etkeni belirleyebilmişlerdir.

### Korunma

*C. sakazakii* enfeksiyonlarından korunma kapsamında, hastanelerdeki bebek ünitelerinde ve evlerde hijyene önem verilmeli, etkenin paslanmaz çelik yüzeylerde ve bu yüzeylerde oluşan biyofilmlerde dezenfektanlara dirençli olması nedeniyle, tezgah vb. temas yüzeylerinde etkili temizlik ve dezenfeksiyon uygulanmalıdır. *C. sakazakii*'nin silikon, lateks, polikarbonat, paslanmaz çelik, cam ve polivinil klorid gibi materyallere tutunabilme özelliği nedeniyle, biberon ve emzikler kaynar suda 5 dakika bekletilmeden kullanılmamalıdır. Bebek maması hazırlama ve muhafaza aşamalarında ya da önceden vakumlanmış anne sütünün muhafazası ve bebeğe verilme aşamalarında hijyene dikkat edilmelidir. Mama hazırlamada kaynamış su kullanılmalıdır. Her öğünde sadece bebeğin tüketebileceği kadar mama sulandırılmalı, tüketim öncesinde oda sıcaklığında ya da buzdolabında bekleme süresi kısa olmalıdır. Biberonla besleme aşamasında bebek mamalarına ve/veya biberonla verilen anne sütüne laktoperoksidaz ilavesi koruyucu olabilir (5,16,20).

### Kaynaklar

1. Amalardjou MAR, Hoagland TA, Venkitanarayanan K, (2009). *Inactivation of Enterobacter sakazakii in reconstituted infant formula by trans-cinnamaldehyde*. Int J Food Microbiol. 129, 146-149.
2. Anonim, (2008). *Türk Gıda Mevzuatı Devam Formülleri Tebliği*. Erişim: <http://www.kkgm.gov.tr/TGK/Tebliğ/2008-53.html>, Erişim tarihi: 15.01.2010.

3. Back SY, Jin HH, Lee SY, (2009). *Inhibitory effect of organic acids against Enterobacter sakazakii in laboratory media and liquid foods*. Food Control, 20, 867-872.
4. Baumgartner A, Grand M, Liniger M, Iversen C, (2009). *Detection and frequency of Cronobacter spp. (Enterobacter sakazakii) in different categories of ready-to-eat foods other than infant formula*. Int J Food Microbiol. 136, 189-192.
5. Beuchat LR, Kim H, Gurtler JB, Lin LC, Ryu JH, Richards GM, (2009). *Cronobacter sakazakii in foods and factors affecting its survival, growth, and inactivation*. Int J Food Microbiol. 136, 204-213.
6. Breeuwer P, Lardeau A, Peterz M, Joosten HM, (2003). *Desiccation and heat tolerance of Enterobacter sakazakii*. J Appl Microbiol. 95, 967-973.
7. Cawthorn DM, Botha S, Witthuhn RC, (2008). *Evaluation of different methods for the detection and identification of Enterobacter sakazakii isolated from South African infant formula milks and the processing environment*. Int J Food Microbiol. 127, 129-138.
8. Dancer GI, Mah JH, Rhee MS, Hwang IG, Kang DH, (2009). *Resistance of Enterobacter sakazakii (Cronobacter spp.) to environmental stresses*. J Appl Microbiol. 107, 1606-1614.
9. Edelson-Mammel SG, Buchanan RL, (2004). *Thermal inactivation of Enterobacter sakazakii in rehydrated infant formula*. J Food Prot 67, 60-64.
10. Farmer III JJ, Asbury MA, Hickman FW, Brenner DJ, the *Enterobacteriaceae Study Group*, (1980). *Enterobacter sakazakii: A new species of "Enterobacteriaceae" isolated from clinical specimens*. Int J Syst Bacteriol. 30, 569-584.
11. **FAO/WHO (Food and Agriculture Organization/World Health Organization)**, (2004). *Joint FAO/WHO workshop on Enterobacter sakazakii and other microorganisms in powdered infant formula: meeting report, MRA series 6*. February, 2-5, Geneva-Switzerland.
12. **FDA (Food and Drug Administration)**, (2002). *Isolation and enumeration of Enterobacter sakazakii from dehydrated powdered infant formula*. Erişim: <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm114665.htm>, Erişim tarihi: 25.01.2010.
13. Gurtler JB, Kornacki JL, Beuchat LR, (2005). *Enterobacter sakazakii: A coliform of increased concern to infant health*. Int J Food Microbiol. 104, 1-34.
14. Hammerman C, Kaplan M. (2006). *Probiotics and neonatal intestinal infection*. Curr Opin Infect Dis. 19, 277-282.
15. Iversen C, Forsythe S, (2003). *Risk profile of Enterobacter sakazakii, an emergent pathogen associated with infant milk formula*. Trends Food Sci Technol. 14, 443-454.
16. Iversen C, Lane M, Forsythe SJ, (2004). *The growth profile, thermotolerance and biofilm formation of Enterobacter sakazakii grown in infant formula milk*. Lett Appl Microbiol. 38, 378-382.
17. Iversen C, Lehner A, Mullane N, Bidlas E, Cleenwerck I, Marugg J, Fanning S, Stephan R, Joosten H, (2007). *The taxonomy of Enterobacter sakazakii: proposal of a new genus Cronobacter gen. nov. and descriptions 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 dublinensis sp. nov. and Cronobacter genomospecies 1*. BMC Evol Biol. 17, 7-64.
18. Kim H, Ryu JH, Beuchat LR, (2006). *Survival of Enterobacter sakazakii on fresh produce as affected by temperature, and effectiveness of sanitizers for its elimination*. Int J Food Microbiol. 111, 134-143.
19. Lee JW, Oh SH, Byun EB, Kim JH, Kim JH, Woon JH, Byun MW, (2007). *Inactivation of Enterobacter sakazakii of dehydrated infant formula by gamma-irradiation*. Radiat Phys Chem. 76, 1858-1861.
20. Lenati RF, O'Connor DL, Hébert KC, Farber JM, Pagotto FJ, (2008). *Growth and survival of Enterobacter sakazakii in human breast milk with and without fortifiers as compared to powdered infant formula*. Int J Food Microbiol. 122, 171-179.
21. Lin LC, Beuchat LR, (2007). *Survival of Enterobacter sakazakii in infant cereal as affected by composition, water activity, and temperature*. Food Microbiol. 24, 767-777.
22. Nazarowec-White M, Farber JM, (1997). *Thermal resistance of Enterobacter sakazakii in reconstituted dried-infant formula*. Lett Appl Microbiol. 24, 9-13.
23. Pagotto FJ, Nazarowec-White M, Bidawid S, Farber JM, (2003). *Enterobacter sakazakii: infectivity enterotoxin production in vitro and in vivo*. J Food Prot. 66, 370-375.
24. Seo KH, Brackett RE, (2005). *Rapid, specific detection of Enterobacter sakazakii in infant formula using a real-time PCR assay*. J Food Prot. 68, 59-63.