



## *Cronobacter sakazakii*'nin Gıda Mikrobiyolojisindeki Önemi

Ahmet GÜNER, Nihat TELLİ ✉

Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Konya.

**Özet:** *Cronobacter sakazakii* birçok yaş grubunda farklı enfeksiyonlara (örn., pnömoni, konjunktivitis, apandisit) sebep olmakla birlikte, özellikle yeni doğan bebeklerde ve çocuklarda menenjit, nekrotik enterokolitis ve bakteriyemiye neden olan bir patojendir. Toz bebek mamalarının tüketimine bağlı olarak son yıllarda yaşanan sağlık sorunları, dünya genelinde toz bebek mamaları üzerine artan sayıda araştırmalar yapılmasına neden olmuştur. Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA), Amerika Birleşik Devletleri'ndeki sağlık kuruluşlarını, toz bebek mamaları ile beslenen yeni doğan bebeklerde *C. sakazakii*'den kaynaklanan enfeksiyonun varlığı hakkında uyarmıştır. Toz bebek mamaları üzerinde yoğunlaşan uluslar arası hassasiyet üzerine, 2004 yılında Gıda ve Tarım Örgütü ve Dünya Sağlık Örgütü (FAO/WHO) neonatal enfeksiyonlar ve toz bebek mamaları ile ilişkili mikroorganizmalar konusunda bir risk yaklaşımı görevini üstlenmişler ve *Cronobacter* spp ve *Salmonella* spp.'yi hijyen kalitesi olarak kategorize etmişlerdir. Bununla birlikte *C. sakazakii*, et, sebze, peynir, tohum, baharat olmak üzere birçok gıdada da tespit edilmiştir. Toz bebek formüllerinde uzun süre canlı kalabilmesinin yanı sıra, tahıl kökenli bebek devam mamalarının, bazı taze meyve ve sebzelerin *C. sakazakii*'nin üremesini desteklemesi ayrıca önem arz etmektedir. Fırsatçı bir patojen olan *C. sakazakii*'nin sebep olacağı gıda kaynaklı enfeksiyonlara karşı başlıca koruyucu önlemler, ısı işlemlerde etkinliğin sağlanmasının yanı sıra, üretim yeri çevresinden ısı işlem sonrası meydana gelebilecek kontaminasyonları ortadan kaldırma yönünde olmalıdır.

**Anahtar kelimeler:** Besin Mikrobiyolojisi, *Cronobacter sakazakii*, Güvenli Gıda.

### The Importance of *Cronobacter sakazakii* in Food Microbiology

**Abstract:** *Cronobacter sakazakii* causes various infections (i.e., pneumonia, conjunctivitis, appendicitis) in most of the age groups and it mostly causes meningitis, necrotic enterocolitis and bacteremia in newborns and children. In recent years there are increasing amount of researches for infant formulas in all of the world because of health problems depending on the consumption of infant formulas. Food and Drug Administration (FDA) has warned the medical centers in USA about *C. sakazakii* infections for newborns that fed with infant formula. As a result of the international growing concern about infant formulas, Food and Agriculture Organizations and World Health Organization (FAO/WHO) have assumed a risk approach mission about microorganisms associated with infant formulas and they have categorized *Cronobacter* spp and *Salmonella* spp as a hygen quality. Additionally *C. sakazakii* has been isolated from various foods such as meat, vegetables, cheese, seed and spices. In addition to surviving for a long time in powdered infant formula, it is also important that powdered infant cereals, some vegetables and fruits support the growth of *C. sakazakii*. The main preventive precautions against foodborne infections caused by opportunistic pathogen *C. sakazakii* are to provide efficient heat treatment and to prevent possible contaminations from production environment that could occur after the heat treatment.

**Key words:** Food Microbiology, *Cronobacter sakazakii*, Safe Food.

## GİRİŞ

*Cronobacter sakazakii*, birçok yaş grubunda çeşitli enfeksiyonlara (örn., pnömoni, konjunktivitis, apandisit) sebep olmakla birlikte (Bowen ve Braden, 2008) özellikle yeni doğan bebeklerde ve çocuklarda menenjit, beyin apseleri ve bakteriyemi vakalarından sorumludur (Nazarowec-White ve Farber, 1997a). Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration-FDA) (2002a), Amerika Birleşik Devletleri'ndeki sağlık kuruluşlarını, toz bebek mamaları ile beslenen yeni doğan bebeklerde *C. sakazakii*'den kaynaklanan enfeksiyonun varlığı hakkında uyarmıştır. Gıdaların Mikrobiyolojik Özellikleri Uluslararası Komisyonu (International Commission on Microbiological Specifications for Foods-ICMSF), 2002 yılında *C. sakazakii*'yi bağışıklık sistemi zayıf insanlar için şiddetli tehlike, yaşamı tehdit eden, kalıcı kronik sekel bırakan etken olarak bildirmiş (Iversen ve Forsythe, 2003; Liu ve ark., 2007) ve bilinen su ve gıda kaynaklı *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum* tip A ve B ve *Cryptosporidium parvum* gibi patojenlerle aynı tehlike kategorisinde sınıflandırmıştır (Iversen ve Forsythe, 2003). Kodeks Gıda Hijyeni Komitesi (Codex Alimentarius Food Hygiene Commission) tarafından 2003 yılında gerçekleştirilen toplantıda; toz bebek mamalarının mikrobiyolojik güvenliği ile ilgili sorunların uluslararası düzeyde arttığı gündeme getirilmiştir. Bunun üzerine Gıda ve Tarım Örgütü (Food and Agriculture Organization-FAO) ve Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization-WHO) tarafından 2004 yılında düzenlenen, toz bebek mamalarında *C. sakazakii* ve diğer mikroorganizmalar konulu uzmanlar toplantısında, mikrobiyolojik tehlikeler üç grup olarak düzenlenmiştir. Buna göre *Salmonella enterica* ve *C. sakazakii* Grup A'da, diğer *Enterobacteriaceae* üyeleri Grup B'de ve o ana kadar toz bebek mamalarından izole edilemeyen *Bacillus cereus*, *Clostridium difficile* ve *Clostridium botulinum* Grup C'de sınıflandırılmıştır (Farber ve ark., 2008). Böylece, *Cronobacter* spp ve *Salmonella* serovarları toz bebek

mamalarının en önemli hijyen indikatörü olarak kategorize edilmiştir (Hurrell ve ark., 2009). *C. sakazakii*, 2004 yılında yirmi üçüncü ISO/TC 34 SC 9 ve onbirinci CEN/TC 275/WG 6 toplantısında, *Mycobacterium paratuberculosis* ile dikkat çekici tehlikeli bakteriyel patojenler olarak çalışma grubunun programına alınmıştır (Skovgaard, 2005).

*C. sakazakii* et, sebze, peynir, tohum, kuru ot, baharat olmak üzere birçok gıdada tespit edilmiş olmasına (Iversen ve Forsythe, 2004) rağmen gıda kaynaklı *C. sakazakii* enfeksiyonlarına sık rastlanmamaktadır (Lampel ve Chen, 2009). Buna karşın, bakterinin toz bebek mamalarındaki varlığı, yeni doğan bebeklerde bağışıklık sisteminin gelişmemiş olması (Iversen ve Forsythe, 2004) ve enfekte bebeklerde gözlemlenen yüksek mortaliteden (%40-80) (Lampel ve Chen, 2009) dolayı daha fazla önem arz etmektedir. Özellikle yeni doğan bebeklerde *C. sakazakii*'nin sebep olduğu enfeksiyonların kaynağı ve bulaşma şekli tam olarak bilinmese de, toz bebek mamalarının neonatal menenjitlerin başlıca sebebi olduğu ileri sürülmüştür (Nazarowec-White ve Farber, 1997c; Nazarowec-White ve Farber, 1999).

## TAKSONOMİSİ

*Enterobacteriaceae* familyasında heterojen ve geniş bir grubu temsil eden *Enterobacter* soyundaki türler son yıllarda artan bir şekilde patojen olarak tanımlanmışlardır. Günümüze kadar 14 tür taksonomik olarak kabul edilmiştir. Bunlardan *Enterobacter cloacae* kompleksindeki 9 tür ile *C. sakazakii* ve *Enterobacter gergoviae*, insanlarda genellikle hastane enfeksiyonlarına neden olan başlıca türlerdir (Dauga ve Breeuwer, 2008).

Pangalos 1929 yılında bir bebekte septiseminin sebebi olarak sarı renkli pigment oluşturan bir koliform bakteri rapor etmiştir (Gurtler ve ark., 2005). *C. sakazakii*, menenjitin etkeni olarak ilk kez Urmeyni ve Franklin tarafından rapor edilmiştir. Önceleri sarı pigment oluşturan *E. cloacae* olarak

bilinen bakteri için 1980 yılında Farmer ve ark tarafından *E. sakazakii* adı önerilmiştir. Tür adını Japon mikrobiyolog Riichi Sakazaki'den almıştır (Gurtler ve ark., 2005). Bakterinin 1980 yılına kadar 15 serovarı tespit edilmiş ve bu serovaryaların birçok türü temsil edebileceği bildirilmiştir (Farmer ve ark., 1980). Bu serovaryaların birçok türü temsil edebileceği bildirilmesine rağmen 2007 yılına kadar, *Enterobacter* soyunda *E. sakazakii* olarak bilinen bir bakteri türüdür. Bu tarihten itibaren, (Iversen ve ark., 2007), DNA-DNA hibridizasyon çalışmaları ile *E. sakazakii*'yi beş genomik türe ayırmışlar ve *E. sakazakii*'nin *Cronobacter* soyunda yeniden klasifiye edilmesi gerektiğini bildirmişlerdir. Iversen ve ark., (2008), Farmer'ın orjinal biyogruplarından 1-4, 7, 8, 11 ve 13'ü *Cronobacter sakazakii*, biyogruplardan 5, 9 ve 14'ü *Cronobacter malonaticus*, grup 15'i *Cronobacter muytjensii*, biyogruplardan 6, 10 ve 12'yi *Cronobacter dublinensis* (biyogrup 12 *Cronobacter dublinensis* subsp. *dublinensis*, biyogrup 6 *Cronobacter dublinensis* subsp. *lausannensis* subsp.), daha sonra tanımlanan grup 16'ya iki suşu hariç *Cronobacter turicensis* ve hariç tutulan bu iki suşu ise *Cronobacter genomospecies* 1 olarak yeniden sınıflandırmışlardır.

## FENOTİPİK ve GELİŞME ÖZELLİKLERİ

*C. sakazakii*; Gram pozitif, çubuk şekilli, peritrik flajellarıyla hareketli, fakültatif anaerob, *Enterobacteriaceae* familyasında yer alan patojen bir bakteridir (Al-Holy ve ark., 2008; Nazarowec-White ve Farber, 1997a). *C. sakazakii* 25°C'de veya oda sıcaklığında inkübe edildiği zaman parlak sarı renkli sıkı-sert yapıda koloni özelliğine sahiptir. *C. sakazakii* iki farklı morfolojiye sahip koloni oluşturur (Iversen ve Forsythe, 2003; Gurtler ve ark., 2005). Bir koloni tipi kuru veya mukoid, sıkı-eleastiki yapıda, diğer koloni tipi ise düz ve yumuşak bir yapıdadır (Gurtler ve ark., 2005). İdentifikasyonun daha ileri aşamalarında pozitif dekarboksilaz (lizin negatif, arjinin ve ornitin pozitif) ve negatif sorbitol reaksiyonları ile tanınabilmektedir (Farmer ve ark., 1980).

*C. sakazakii*'nin generasyon süresi 23 °C'de 40 dakika, 10 °C'de'de 4 saat 54 dakikadır. Gerek klinik örneklerden gerekse gıdalardan elde edilen *C. sakazakii* izolatlarının değişik besiyerlerinde üreme ve canlılığının incelendiği çalışma sonuçlarına göre en düşük 5,5-8,0 °C'de ürettiği, 4 °C'de üremenin gerçekleşmediği ve bu sıcaklık derecesinde yapılan depolama sırasında canlılığını kaybettiği bildirilmiştir (Nazarowec-White ve Farber, 1997b). Buna karşın, gelişme özellikleri, ısı toleransı ve bakterinin biofilm oluşturma özelliklerinin incelendiği araştırmada buzdolabı sıcaklık değerlerinde tutulan bebek mamasının hazırlandığı alet ve ekipmanlarda *C. sakazakii*'nin ürettiği bildirilmiştir (Iversen ve ark., 2004b).

Iversen ve ark. (2004b), sulandırılmış toz bebek mamalarında 62 °C'de D değerini 0.4 dakika, Z değerini ise 5.7°C olarak belirlemişlerdir. Nazarowec-White ve Farber (1997c), sulandırılmış toz bebek mamalarında 52, 54, 56, 58 ve 60 °C'de D değerlerini sırasıyla 54.8, 23.7, 10.3, 4.2 ve 2.5 dakika olarak tespit etmişlerdir. pH 7,0'deki ısı direncinin pH 4,0'dekine göre 10 kat fazla olduğu tespit edilmiştir (Arroyo ve ark., 2009).

Yüksek ozmotik basınç ve kuru ortamlara oldukça dirençlidir ve kuru ortamlarda 2 yıldan fazla yaşayabilir (Osaili ve Forsythe, 2009). Mezofil sıcaklık derecelerinde 1M NaCl konsantrasyonlarına kadar gelişme gösterebilir. 45°C'de 0.5M NaCl varlığında optimum üremeye devam ettirmektedir (Dauga ve Breeuwer, 2008). Su aktivitesinin 0,96'ya düşmesiyle pH 4,0 değerlerine sahip ortamlarda ortaya çıkan direncin pH 7,0'deki yüksek su aktivitesi değerlerine (>0.96) sahip olanlara göre 32 kat arttığı bildirilmiştir (Arroyo ve ark., 2009). Nitekim, toz bebek mamalarındaki kontaminant *C. sakazakii* sayısının depolama sırasındaki seyri bakımından yapılan çalışmada, inokule edilen *C. sakazakii* sayısının +4 °C'de yapılan depolama sırasında farklı su aktivitesi değerlerine sahip bebek mamalarında önemli bir farklılığın oluşmadığı; 21 °C'de depolama sırasında 0.44 su aktivitesi değerine sahip mamalar-

daki bakterinin 6 ayda tespit edilebilir sayıların altına düştüğü, 0.31 ve 0.26 su aktivitesi değerine sahip olanlarda 12 ay sonunda 5 log kob/g'dan 3 log kob/g'a düştüğü; 30 °C'de depolama sırasında 0.44 su aktivitesi olanlarda 3. ay, 0.31 su aktivitesi olanlarda 9 ay ve 0.26 su aktivitesi olanlarda 12 ay sonunda tespit edilebilir seviyelerin altında kaldığı saptanmıştır (Beuchat ve ark., 2009).

## ENFEKSİYON TABLOSU ve PATOJENİTESİ

*C. sakazakii* başlıca menenjit, bakteriyemi, üriner sistem ve yara enfeksiyonunun yanı sıra pnömoni, konjunktivitis, vajinitis, apandisit, yeni doğanlarda nekrotik enterokolitis vb enfeksiyonların etiolojisinde yer alır (Bowen ve Braden, 2008). Birçok yaş grubunda farklı enfeksiyonlara sebep olmakla birlikte özellikle yeni doğan bebeklerde ve çocuklarda menenjit, beyin apseleri ve bakteriyemiye sebep olduğu bildirilmiştir (Farmer ve ark., 1985; Gurtler ve ark., 2005).

Lai (2001), 1960 yılından 1999'a kadar yaptığı literatür taramasında, yeni doğan, bebek ve küçük çocuk hastalarda kayıtlara geçmiş 31 *C. sakazakii* enfeksiyon vakasından 21'inin menenjit, 7'sinin bakteriyemi, 1'inin üriner sistem enfeksiyonu, 1'inin diyare, 1 tanesinin ise dermoid kist olduğunu bildirmiştir.

İlk defa İngiltere'de sarı pigment oluşturan *E. cloacae*'nin sebep olduğu menenjit vakaları daha sonra Avrupa'nın farklı ülkelerinden de bildirilmiştir (Iversen ve Forsythe, 2003). Willis ve Robinson (1988) 8 günlük ve 4 haftalık iki bebekte *C. sakazakii*'nin neden olduğu menenjit vakasını, Biering ve ark., (1989) üç neonatal enfeksiyonun görüldüğü iki bebeğin beyninin sol tarafının zarar gördüğünü bildirmişlerdir.

Nekrotik enterokolitis, değişik patojen bakterilerin sebep olduğu yeni doğan bebeklerde çok yaygın görülen önemli bir gastrointestinal rahatsızlıktır (Iversen ve Forsythe, 2003). van Acker ve ark., (2001) nekrotik enterokolitis gelişen 12 bebeğin

altısında *C. sakazakii*'nin izole edildiğini bildirmişlerdir.

*C. sakazakii*'nin neden olduğu bakteriyemi bütün yaş gruplarında meydana gelmiştir (Bowen ve Braden, 2008). Burdette ve Santos (2000), septisemi belirtisi olan 6 günlük bir çocuğun kan, idrar, serebrospinal sıvı ve beyindeki abseden alınan purulent sıvıdan *C. sakazakii*'nin tespit edildiğini bildirmişlerdir. Bu bakterinin yetişkinlerde neden olduğu enfeksiyon nadir olarak bildirilmiştir. Bakteriyemi şüphesiyle hastaneye yatırılan 75 yaşındaki bir hastanın kanından (Hawkins ve ark., 1991) ve değişik yaş gruplarındaki insanların spinal sıvı, kan, yara ve solunum sisteminden alınan örneklerden yapılan kültürlerde *C. sakazakii*'nin izole edildiği bildirilmiştir (Farmer ve ark., 1985)

*C. sakazakii*'nin patojenik mekanizması yada virulens faktörleri ile ilgili yeterli çalışma bulunmamaktadır (Nazarowec-White ve Farber, 1997a). *C. sakazakii*'nin toksin benzeri bileşikler ürettiği ve süt emen farelere  $10^3$  ve  $10^5$  düzeylerinde oral ve intraperitoneal yolla verildiği zaman patojenik etki gösterdiği bildirilmiştir (Nazarowec-White ve Farber, 1997a). Ayrıca proteaz, fosfataz ve lipaz aktivitelerinin, *C. sakazakii* enfeksiyonu sırasında hücre ölümlerine yol açtığı, üremenin farklı fazlarında insan epiteline adhezyon özelliğinin olduğu, Caco-2 hücrelerine tutunma ve invaze olma özellikleri gösterdiği tespit edilmiştir (Pagotto ve ark., 2008). *C. sakazakii*'nin minimum enfeksiyon dozu tam olarak tanımlanmasa da (Iversen ve Forsythe, 2003), *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* 4b ve *Neisseria meningitidis* için bildirilen sayının (yaklaşık 1000 bakteri), bu bakterinin minimum enfeksiyon dozu olarak kabul edilebileceğini ileri sürmüşlerdir. Enfeksiyöz doz, bakterinin stres faktörlerine maruz kalıp kalmamasına ve bakteriyi alan kişinin sağlıklı veya bağışıklık sisteminin zayıf olup olmasına bağlı olarak değişebilir (Iversen ve Forsythe, 2003). Kontamine parçalayıcı veya kaşık gibi bakteri sayısı yüksek alet ve ekipmanların kullanılması vb yetersiz hijyen koşullarında enfeksiyon riski artmaktadır

(Iversen ve Forsythe, 2003). Ayrıca yeni doğanlar, özellikle çok düşük doğum ağırlıklı (1500 gramdan düşük) bebekler, bağışıklık sistemlerinin tam gelişmemesinden dolayı çok daha duyarlıdır. Bunların yanı sıra antibiyotik uygulaması ve intestinal travma riski artıran durumlardır (Towsend ve Forsythe, 2008).

## ENFEKSİYONUN KAYNAKLARI ve İNSİDENSİ

Doğal çevresi tam olarak bilinmemesine rağmen, çevrede oldukça yaygın bir bakteridir (Kandhai ve ark., 2004a; Al-Holy ve ark., 2008; Kandhai ve ark., 2010; Wan-Ling ve ark., 2010). *C. sakazakii*'nin epidemiyolojisi enfeksiyonun sık gözükmemesi ve birçok ülkede rapor edilmemesine bağlı olarak tam manasıyla anlaşılabilir (Bowen ve Braden 2008). Aynı araştırmacılar bu bakterinin yeni doğan bebekler ve bağışıklık sistemi zayıf kişilerdeki insidensinin (1/100.000) diğer yaş gruplarına göre daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir.

### Klinik Kaynaklar

*C. sakazakii* serebrospinal sıvı, kemik iliği, tükürük, idrar, yangılı apendiks, sindirim ve solunum sistemi, göz, kulak, yara, dışkı ve hastane ortamından izole edilmiştir (Nazarowec-White ve Farber, 1997c; Nazarowec-White ve Farber, 1999). Nekrotik enterokolitis gelişen 12 bebeğin mide sıvısı, anal swab ve kan örneklerinden yapılan kültürlerde geliştiği (van Acker ve ark., 2001), buna karşın 93 yeni doğan bebeğin dışkı, kan ve serobrospinal sıvı örneğinde *Cronobacter* spp. tespit edilmediği bildirilmiştir (Hoque ve ark., 2010).

### Çevresel Kaynaklar

Bakterinin sağlıklı insan tarafından fekal yolla bulaşması henüz bildirilmemiştir (Forsythe, 2005). Koliform bakterisi olan *Escherichia coli*'nin başlıca bulaşma yolu fekal kaynaklı olmasına rağmen, diğer koliform bakterilerinde olduğu gibi *C. sakazakii*'de çevresel kaynaklar vasıtasıyla bulaşabilir (Gurtler ve

ark., 2005). Toprak, su ve sebzeler başlıca kontaminasyon kaynaklarıdır. Ratlar ve sinekler kontaminasyonun diğer kaynakları olarak kabul edilir (Nazarowec-White ve Farber, 1997c; Nazarowec-White ve Farber, 1999).

Kandhai ve ark., (2004a), toz bebek maması üreten dokuz fabrikanın sekizinde, 16 evin beşinde, ayrıca üretimin yapıldığı hat boyunca ve fabrikalardaki bütün çevresel kaynaklarda, farklı düzeylerde *C. sakazakii* tespit etmişlerdir. Kandhai ve ark., (2004b) üç süt tozu üretim fabrikasının zemininden, kurumuş kazıntılardan ve vakumlu temizlik torbalarından aldıkları 152 örneğin 18 tanesinde *C. sakazakii*'nin varlığını belirlemişlerdir. Reich ve ark., (2010) toz bebek maması üreten bir işletmenin vakumlu temizlik noktaları, doldurma makineleri ve doldurma hattından topladıkları örneklerden sırasıyla %28, %5,3 ve %8 oranında *Cronobacter* spp. tespit ettiklerini bildirmişlerdir.

Schmid ve ark., (2009), iki *C. sakazakii* suşunu bitki köklerinden izole etmişlerdir. İnsan dışkı (1/98) ve derisinde (1/116) *Cronobacter* spp. tespit edilmesine karşın (Kandhai ve ark., 2010) sığır dışkısında, çiftlik topraklarında ve sularında bu bakteri izole edilememiştir (Molloy ve ark., 2009).

### Gıda Kaynakları

Hayvansal ve bitkisel kökenli birçok gıdada tespit edilen *C. sakazakii*'nin çok değişik gıda üretim çevresinde bulunması, gıdaların üretimi sırasında risk teşkil eden konuların başında gelmektedir (Beuchat ve ark., 2009; Kandhai ve ark., 2010).

*C. sakazakii*'nin bakterileri inaktive edecek herhangi bir işlem veya uygulamaya maruz bırakılmayan çeşitli gıda ve içeceklerde bulunması, tahıl kökenli bebek mamalarının yanısıra bazı taze meyve ve sebzelerin *C. sakazakii*'nin üremesini desteklemesi, güvenlik riski hakkındaki endişeyi yalnızca bebeklerde değil aynı zamanda bağışıklık sistemi zayıflamış yaşlı tüketicilerde de arttırmaktadır (Beuchat ve ark., 2009).

*C. sakazakii*; et, sebze, peynir, tohum, kuru ot, baharat olmak üzere birçok gıdada tespit edilmiştir (Iversen ve Forsythe, 2004). Kandhai ve ark., (2010) real-time PCR yöntemiyle süt tozları, 1 yaş altı bebek mamaları, bir yaş üstü bebek mamaları, diğer çabuk çözünen toz gıdalar, kurutulmuş hububat, kıyma ve sebzelerde varlığını saptamışlardır. Iversen ve Forsythe (2004), toz bebek mamasında, kurutulmuş bebek gıdasında, süt tozunda, peynirlerde, baharat ve kuru otta bakterinin varlığını tespit etmişlerdir. Molloy ve ark., (2009), sığır dışkısında, çiftlik topraklarında ve sularında bu bakteriyi izole edememelerine karşın, sığır besinleri, domuz eti, sığır eti ve kıymaları, sığır eti burgerleri ve organik buğdaydan üretilmiş kahvaltılıklarda varlığını saptamışlardır.

Bulaşma yolu tam olarak bilinmemekle birlikte, kontamine toz bebek mamaları ve onun hazırlanmasında kullanılan ekipmanlar *C. sakazakii*'nin başlıca kaynağı olarak bilinir (Bowen ve Braden, 2008; Fanning ve Forsythe, 2008). Dolayısıyla sulandırılmış toz bebek mamalarındaki *C. sakazakii*'nin kontaminasyonu, iç faktörler (örn., kontamine ingrediyenlerin pastörizasyon sonrası kullanımı, paketlenme öncesi üretim ortamları) ve mamanın sulandırılması ve hazırlama işlemlerinin diğer aşamaları sırasında oluşan harici kontaminasyonlardan (örn., hijyenik olmayan alet ve edevat kullanılması) kaynaklanır (Fanning ve Forsythe, 2008). Muyltjens ve ark., (1988), 35 ülkeden elde ettikleri 141 bebek mamasının %52,5'inde *Enterobacteriaceae* üyelerinin izole edildiğini, en sık rastladıkları türlerden *E. agglomerans*, *E. cloacae*, *C. sakazakii* ve *Klebsiella pneumoniae*'yi sırasıyla; 35, 30, 20 ve 17 örnekte tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Araştırmacılar hiçbir üründe *Enterobacteriaceae* üyesi bakterilerin sayısının 1 kob/g'ın üzerinde olmadığını ve *Enterobacteriaceae* sayısı bakımından FAO tarafından istenilen mikrobiyolojik kritere (< 3 kob/g toz mama) uygun olduğunu bildirmişlerdir. Nazarowec-White ve Farber (1997b), Kanada'da marketlerden elde edilen 120 bebek mamasının

8'inde *C. sakazakii*, (Hoque ve ark., 2010), Bangladeş'te marketlerden topladığı 32 toz bebek mamasının yalnızca bir tanesinde *Cronobacter* spp., (Terragno ve ark., 2009), Arjantin'de üç farklı marka ithal toz bebek mamalarında *C. sakazakii*'nin varlığını belirlemişlerdir. Block ve ark., (2002) *C. sakazakii*'nin toz bebek mamalarında tespit edilemediğini, buna karşın hazırlanmış bebek mamalarında ve mamaların hazırlanmasında kullanılan parçalayıcılarda saptandığını bildirmişlerdir. Clark ve ark., (1990) menenjit ve bakteriyemi semptomları gösteren her iki hastadan ve tükettikleri toz bebek mamalarından yapılan kültürlerden *C. sakazakii*'nin izole edildiğini, Simmons ve ark., (1989) hasta bebeklerden ve bebek mamalarından izole edilen *C. sakazakii*'nin benzer plazmid ve enzim profillerine sahip olduğunu bildirmişlerdir.

## ENFEKSİYONDA RİSK FAKTÖRLERİ

### Isıl İşlemlere Karşı Dayanıklılık

Yüksek sıcaklık derecelerine direnci *Enterobacteriaceae*'nin birçok üyesinden yüksek bulunmuştur. Ancak yüksek sıcaklığa dirençli birçok *C. sakazakii* suşu, standart bir pastörizasyon işlemiyle 8 log düzeyinde bir azalma göstermektedir (Dauga ve Breeuwer, 2008). Sulandırılmış toz bebek mamalarında 52, 54, 56, 58 ve 60 °C'de D değerleri sırasıyla 54,8, 23,7, 10,3, 4,2 ve 2,5 dakika olarak tespit edilmiştir (Nazarowec-White ve Farber, 1997c).

Wan-Ling ve ark., (2010), 47 °C'de 15 dakika ısı şokuna maruz kalmış *C. sakazakii*'yi yağsız süte 8 log kob/ml düzeyinde inoküle ettikten sonra laktik asit bakterilerince gerçekleştirilen 24 saatlik fermentasyon sonrası, canlı kalan bakteri sayısını 5,93-6,01 log kob/ml, ısı şoku uygulanmamış hücrelerde ise 4,96-4,99 log kob/ml olarak tespit etmişlerdir. Araştırmacılar letal sıcaklık derecesinin altında veya maksimum üreme sıcaklık derecesinin birkaç derece üzerinde uygulanacak ısıl işlemlerin, bakterinin maruz kalacağı letal stres faktörlerine karşı direnç geliştirmesine sebep olduğunu bildirmiş-

lerdir. Bununla birlikte sprey kurutma, dondurarak kurutma ve yağsız sütteki laktik fermentasyona karşı ısı şoku uygulanmamış hücelere göre daha fazla dayanıklılık gösterdiğini ileri sürmüşlerdir.

Arroyo ve ark., (2009), pH 7,0'deki ısı direncinin pH 4,0'dekine göre 10 kat fazla olduğunu, ancak pH 4,0'te su aktivitesinin 0,96'ya düşmesiyle ortaya çıkan direncin pH 7,0'deki yüksek su aktivitesi değerlerine (>0.96) sahip olanlara göre 32 kat arttığını bildirmişlerdir.

### Osmotik Basınca ve Kurutmaya Direnç

*Cronobacter* spp. osmotik basınç ve kuru ortamlarda meydana gelen strese karşı direnci bilinen ve kuru ortamlarda 2 yıldan fazla yaşayabilen bir bakteridir (Osaili ve Forsythe, 2009). Durağan fazdaki *Cronobacter* hücrelerinin kuruma ve osmotik strese karşı direnci *E. coli*, *Salmonella* ve *Enterobacteriaceae*'nin diğer üyelerinden daha yüksek bulunmuştur (Dauga ve Breeuwer, 2008; Osaili ve Forsythe, 2009). *C. sakazakii* mezofil sıcaklık derecelerinde 1M NaCl konsantrasyonlarına kadar gelişme gösterebilir (Dauga ve Breeuwer, 2008). Al-Nabulsi ve ark., (2009) 2.5 mg/ml lactoferinin (LF) içeren %0.2'lik peptonlu suda, 37 °C'de 4 saat muamele sonunda kurutulma işlemine maruz kalmamış *Cronobacter* spp.'de 4log kob/ml'lik bir azalma olduğunu tespit etmişlerdir. Buna karşın kurutulmaya maruz kalmış *Cronobacter* spp.'de 21 ve 37 °C'de 1 saat, 10 °C'de 8 saat yapılan uygulamanın 4log kob/ml'lik bir azalmaya sebep olduğunu saptamışlardır. Bununla birlikte kurutulmaya maruz bırakılmış *Cronobacter* spp.'nin nisine karşı dayanıklı olduğunu bildirmişlerdir (Al-Nabulsi ve ark., 2009).

### Biofilm Oluşturma Özellikleri

Bazı bakteri ve mantarlar yüzeylere tutunduktan sonra ekzopolisakkaritler üreterek biofilm oluşturabilirler. *C. sakazakii*'nin abiyotik materyallere (örn., silikon, lateks, polikarbonat, paslanmaz çelik, cam ve polivinil klorid) tutunup biofilm oluşturduğu bildirilmiştir (Beuchat ve ark., 2009; Iversen ve ark.,

2004b). *Enterobacteriaceae* üyelerinin bakteriyel biofilm oluşturması 24 saat sonrasında yaklaşık  $10^5$ - $10^6$  kob/cm<sup>2</sup>'dir. Buna karşın, *Acinetobacter* gensp. 13 kayda değer olmayan yoğunlukta bir biofilm oluştururken, *C. sakazakii* ATCC 12868 suşu  $10^7$  kob/cm<sup>2</sup> ile en yoğun biofilm tabakası oluşturmuştur (Hurrel ve ark., 2009). *C. sakazakii*'nin bebek biberonlarının iç yüzeyinde sekiz saat içerisinde  $10^7$  kob/ml, 24 saat içerisinde  $10^9$  kob/ml hücre yoğunluğuna eriştiği bildirmiştir (Hurrel ve ark., 2009).

### Asit Ortamlara ve Dezenfektanlara Direnci

*C. sakazakii*'nin asit ortamlara direnci konusunda fazla çalışma bulunmamaktadır. pH'sı HCl ile ayarlanmış tryptone soy broth'da minimum gelişme pH'sı 3.9 olarak bildirilmiştir (Dauga ve Breeuwer, 2008).

Sanitasyon maddeleri ve dezenfektanlara karşı direnci; dezenfektanın tipi, miktarı, bakteriyi çevreleyen organik maddenin çeşidi, maruz kalma zamanına bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Beuchat ve ark., 2009).

### İZOLASYONUNDA KULLANILAN METOTLAR

*C. sakazakii*'nin varlığını belirlemede kullanılan hızlı ve uygun yeterli sayıda metot olmaması ve bakterinin rutin olarak araştırılmamasından dolayı, çevrede *C. sakazakii*'nin varlığı ve sebep olduğu vaka sayısı tam olarak tahmin edilememektedir (Al-Holy ve ark., 2008).

### Klasik Mikrobiyolojik Metotlar

Gıdaların hijyenik kalitesini belirlemede kullanılan klasik kültürel yöntemler, indikatör mikroorganizmaların belirlenmesinin yanı sıra patojenlerin belirlenmesinde de temel teşkil etmektedir (Leclercq ve ark., 2002). *C. sakazakii* enterik bakterilerin izolasyonunda kullanılan MacConkey, eosin methylene blue ve deoxycholate agar vb besiyerlerinde üreyebilir (Iversen ve Forsythe, 2003). Günümüze kadar, *C. sakazakii*'nin gıda ve çevresel

kaynaklardan izolasyonunda; klasik kültürel yöntemler kullanılarak yapılan mikrobiyolojik çalışmalarda birçok diferensiyel ve selektif besiyerleri (Beuchat ve ark., 2009) ve farklı metotlar (Fanning ve Forsythe, 2008) geliştirilmiştir (Tablo 1).

FDA'nın, toz bebek mamalarında *C. sakazakii*'nin aranmasında önerdiği metot oldukça zaman alıcı bir yöntemdir (Tablo 2). *C. sakazakii*'nin izolasyon ve identifikasyonu için FDA'nın önermiş olduğu metot, Muyltjens ve ark (1998)'nin önermiş olduğu metoda, tamponlanmış peptonlu su yerine steril distile suda yapılan ön zenginleştirme işlemi dışında benzerlik göstermektedir (FDA, 2002b; Al-Holy ve ark., 2008; Fanning ve Forsythe, 2008; Druggan ve Iversen, 2009). ISO'nun çıkarmış olduğu Süt ve Süt Ürünlerinde Enterobacter sakazakii'nin

belirlenmesi konulu standartta (ISO, 2006) bildirilen ISO yöntemi ön zenginleştirme ve zenginleştirme işlemleri ile izolasyonda kullanılan kromojenik boya içeren selektif katı besiyeri ve inkübasyon sıcaklık dereceleri bakımından FDA'nın yönteminden oldukça farklıdır (Tablo 3).

Son yıllarda geliştirilen besiyerleri, *C. sakazakii*'nin  $\alpha$  glucosidase üretimini ve aktivitesini ortaya koyan elektif florojenik boyaların kullanılması üzerinde yoğunlaşmıştır. Konu üzerinde ilk çalışmayı (Oh ve Kang, 2004),  $\alpha$  glucosidase'in reaksiyona girdiği 4-methylumbelliferyl-  $\alpha$ -D-glucopyronidase (MU $\alpha$ Glc) içeren ve floresans veren *C. sakazakii* kolonilerinin olduğu OK besiyerini kullanarak gerçekleştirmişlerdir.

**Tablo 1.** Toz Bebek Mamalarında *Cronobacter sakazakii*'nin Tespitinde Başvurulan Başlıca Kültürel Metotlar

**Table 1.** Main cultural methods applied for determining *Cronobacter sakazakii* in infant cereals

Metot	Ön zenginleştirme	Selektif zenginleştirme	İlk izolasyon	Tahmini identifikasyon
FDA	DW (37 °C)	EE broth (37 °C)	VRBGA	TSA'da 25 °C'de 48-72 saat sonra sarı pigment
DFI	BPW (37 °C)	EE broth (37 °C)	DFI agar (37 °C)	Mavi-yeşil koloniler
NES	BPW (37 °C)	mLST+vancomycin (45 °C)	TSA (37 °C)	Sarı, $\alpha$ -glucosidase pozitif koloniler
AES	ESSB (37 °C)	ESSB (37 °C)	ESIA (44 °C)	Mavi-yeşil koloniler
R&F	DW	EE broth (37 °C)	ESPM	Mavi-mavi-gri koloniler

FDA: Food Drug Administration; DFI: Druggan Forsythe Iversen; NES: Nestle; AES: AES Laboratoire; R&F: R&F Laboratories; DW: Distilled water; BPW:Buffered peptone water; ESSB: Enterobacter sakazakii selective broth; EE: Enterobacteriaceae enrichment; mLST: Modified lauryl sulfate tryptose; VRBGA: violet red bile glucose agar; TSA: Tryptone soy agar; ESIA: Enterobacter sakazakii isolation agar; ESPM: Enterobacter sakazakii plating medium.

MU $\alpha$ Glc'in, *Cronobacter* spp için kromojenik bir boya olan 5-bromo-4-chloro-indolyl- $\alpha$ -D-glucopyronidase (X $\alpha$ Glc)'dan daha az spesifik olması üzerine *Cronobacter* spp izolasyonunda kromojenik boya içeren besiyerleri geliştirilmiştir (Druggan ve Iversen, 2009). Iversen ve ark.,'nin (2004a) geliştirdiği Druggan-Forsythe-Iversen agarda,  $\alpha$  glucosidase'in substratı olarak 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside bulunmaktadır. Bakterinin salgıladığı enzim ve besiyerine katılan bu substrat arasında meydana gelen reaksiyon sonucunda mavi-yeşil koloniler oluşmaktadır.

Popülasyonun heterojenliği ve yeterli biyokimyasal verilerin olmayışının yanı sıra, biyokimyasal identifikasyon striplerinin zayıflığı da *Cronobacter* spp.'lerin izolasyon ve identifikasyonlarında kullanılan besiyerlerinde yeni arayışlar getirmiştir. Bunlardan birisi, iki kromojenik boya içeren besiyerlerinin kullanılmasındadır. Bu amaçla geliştirilen Enterobacter Sakazakii Plating Medium (ESPM), diğer kromojenik besiyerlerinde olduğu gibi X $\alpha$ Glc'un yanı sıra bir trisakkarit analogu olan 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-glucopyronaso-  $\beta$ -D-glucopyronoside (X-cellobiose) içerir. ESPM bir pH



indikatörü'nün yanı sıra adonitol, sorbitol, D-arabitol gibi fermente edilebilir karbonhidratları içerir (Druggan ve Iversen, 2009).

*C. sakazakii*'nin izolasyonunda kullanılan besiyerleri içerisindeki selektif bileşenlerin, stres altında kalmış ve zarar görmüş *C. sakazakii* hücrelerinin kurtarılmasında, olumsuz etkide bulunduğu bildirilmiştir. Joosten ve ark., (2008), *Enterobacteriaceae* üyesi 95 türden dokuz türün (yedi *C. sakazakii*, bir *C. malonaticus*, bir *Enterobacter amnigenus*) Enterobacteriaceae Enrichment Broth (EE)'da gelişiminin inhibe olduğunu, hücre ölümüne sebep olan faktörlerin, besiyerinin bileşiminde bulunan safra tuzları ve boyalar olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Ayrıca yüksek sıcaklık ve kurutma şartlarında yaşaması dolayısıyla toz bebek mamalarının mikrobiyasında bulunabilecek *Bacillus* türleri Gram negatif bakterilere karşı etkili olan polimiksin ve kolitsin gibi antimikrobiyel metabolitler üretirler. Bu olumsuz faktörleri ortadan kaldırmak için *Enterobacteriaceae* aranmasında ön zenginleştirmede kullanılan tamponlanmış peptonlu suya 40 µM 8-

hydroxyquinoline, 0.5 gL<sup>-1</sup> ammonium iron (III) citrate, 0.1 gL<sup>-1</sup> sodium deoxycholate ve 0.1 gL<sup>-1</sup> sodium pyruvate ilavesinin, deneysel ve doğal kontamine olmuş örneklerden *Enterobacteriaceae* üyelerinin geri alınmasını geliştirdiği bildirilmiştir (Weber ve ark., 2009). Al-Holy ve ark., (2008), toz bebek mamalarında stres faktörlerine maruz bırakılmış *C. sakazakii* hücrelerini geri almada OK besiyeri, Violet Red Bile Agar (VRBA), Druggan-Forsythe-Iversen (DFI), *Enterobacteriaceae* enrichment agar (EEA) ve fecal coliform agar (FCA) olmak üzere beş farklı selektif besiyeri kullanmışlardır. Araştırmacılar yanı sıra %0.1 sodyum piruvat içeren TSA üzerine ince bir tabaka oluşturacak şekilde bu beş besiyerinin her birinden ayrı ayrı 8 ml katarak overlay metotunu da denemişler ve bu metodun stres altındaki *C. sakazakii* hücrelerini belirlemede daha etkili olduğunu ileri sürmüşlerdir. Lampel ve Chen (2009), aynı toz bebek mamalarından *C. sakazakii* izolasyonunun, bazen DFI agarda bazende R&F agarda gerçekleştirilemediğini dolayısıyla her iki agarın *C. sakazakii* izolasyonunda birlikte kullanılması gerektiğini önermişlerdir.

**Tablo 2.** *Cronobacter sakazakii* İzolasyon ve İdentifikasyonunda FDA Yöntemi

**Table 2.** FDA Technique for Isolation and Identification of *Cronobacter sakazakii*

Gün	Safhalar
0	Üç ayrı tüpe 1 g toz maması konularak 9 ml 45 °C steril distile suyla çözündürülür. 36 °C'de 18 saat inkübe edilir. Üç ayrı erlene 10 g toz maması konulara 90 ml 45 °C steril distile suyla çözündürülür. 36 °C'de 18 saat inkübe edilir. Üç ayrı erlene 100 g toz maması konulara 900 ml 45 °C steril distile suyla çözündürülür. 36 °C'de 18 saat inkübe edilir.
1	Ön zenginleştirme yapılan her bir örnekten 10 ml alınarak 90 ml EE broth bulunan pyrex şişelere alınır. 36 °C'de 24 saat inkübe edilir
2	Her bir örnekten 0.1ml VRBGA üzerine yayılarak ekilir. 36 °C'de 24 saat inkübe edilir. Her bir örnekten 0.1 µl VRBGA üzerine özeyle çizilerek ekilir. 36 °C'de 24 saat inkübe edilir
3	Beş <i>Cronobacter sakazakii</i> şüpheli koloni TSA'ya geçilir ve 25 °C'de 48-72 saat inkübe edilir Oksidaz negatif sarı renkli koloniler biyokimyasal testlere tabi tutulur veya
5/6	API 20E uygulamak için oksidaz negatif koloniler biyokimyasal test striplerine aktarılır. Stripler 36 °C'de 24 saat inkübe edilir
6/7	Biyokimyasal sonuçlar yorumlanır.

FDA: Food Drug Administration; EE: Enterobacteriaceae enrichment; VRBGA: Violet red bile glucose agar; TSA: Tryptone soy agar

**Tablo 3.** *Cronobacter sakazakii* İzolasyon ve İdentifikasyonunda ISO Yöntemi**Table 3.** ISO Technique for Isolation and Identification of *Cronobacter sakazakii*

Gün	Safhalar
0	50 g toz bebek maması 450 ml steril TPS içerisinde çözündürülür ve 37 °C'de 18 saat ön zenginleştirme için inkübe edilir.
1	Ön zenginleştirme yapılan örnekten 0.1 ml 10 ml modifiye LST (01ml vancomycin içerir) bulunan tüplere alınır ve 44 °C'de 24 saat inkübe edilir
2	Zenginleştirme örneklerinden bir öze dolusu (0.1 µl) ESIA üzerine özeyle ekilir ve 44 °C'de 24 saat inkübe edilir
3	Beş <i>Cronobacter sakazakii</i> şüpheli koloni TSA'ya geçilir ve 25 °C'de 48 saat inkübe edilir
5/6	Sarı renkli koloniler biyokimyasal testlere tabi tutulur ve biyokimyasal sonuçlar yorumlanır

TPS:Tamponlanmış peptonlu su; LST: Lauryl sulfate tryptose; ESIA:Enterobacter sakazakii izolaiton agar; TSA:Tryptone soy agar

### Polymerase Chain Reaction (PCR)

İzolasyon besiyerlerinde tipik koloni morfolojisinin varlığı yalnızca tahmini bir identifikasyondur ve gerçekte bu kolonilerin aranan mikroorganizma olup olmadığının doğrulanması oldukça önemlidir. İdentifikasyon işlemleri genellikle biyokimyasal testlerle gerçekleştirilirse de moleküler identifikasyon yöntemleri son yıllarda artarak kullanılmaktadır (Druggan ve Iversen, 2009). Birçok PCR denemesi *C. sakazakii*'yi tespit etmek amacıyla gerçekleştirilmiştir (Fanning ve Forsythe, 2008).

Kandhai ve ark., (2010), real-time PCR yöntemiyle süt tozları, bebek mamaları, diğer çabuk çözünen toz gıdalar, kurutulmuş hububat, kıyma ve sebzelerde *C. sakazakii* varlığını tespit etmişlerdir. Hoque ve ark., (2010), 32 toz bebek mamasının yalnızca bir tanesinde, DFI agarda mavi-yeşil koloni oluşumu ile karakterize olan *Cronobacter spp.*' nin kültürel olarak tanımlanmasını takiben, α glucosidase enzimini hedef alan gen sırası dizilimini PCR ile belirleyerek etkeni identifiye etmiştir.

Liu ve ark., (2007), PCR ve real time PCR'ın doğru ve duyarlı sonuçlar verdiğini ancak gelişmekte olan ülkelerde PCR ekipmanlarının temini ve yetişmiş personelin azlığından dolayı uygulanmasında sıkıntılar olduğundan, hedef bölgenin hızlı ve etkin olarak çoğaltılmasına dayanan Loop-Mediated Isothermal Amplification olarak bilinen tek tüpte mikrobiyolojik tanıyı *C. sakazakii*'nin tespitinde

kullanmışlar ve metodun duyarlılığını 1.2 kob/100g olarak bildirmişlerdir.

Fanning ve Forsythe (2008), bakterilerin proteini veya nükleik asit profillerinin çıkarılmasıyla gerçekleştirilen moleküler tiplendirmelerin; gıda kaynaklı hastalıklarda yer alan izolatların epidemiyolojik bilgilerini elde etmede kullanılan bir yaklaşım olduğunu ifade etmişlerdir. Bu amaçla *C. sakazakii*'nin moleküler olarak tiplendirilmesinde PFGE, RAPD ve ribotiplendirme yöntemleri kullanılmıştır (Fanning ve Forsythe, 2008).

### SONUÇ

Birçok yaş grubunda, özellikle vücut direnci düşük veya bağışıklık sistemi zayıflamış insanlarda, değişik enfeksiyonlarda (örn., pnömoni, konjunktivitis, apandisit), yeni doğan bebeklerde ve çocuklarda menenjit, beyin apseleri ve bakteriyemi vakalarında tespit edilen *C. sakazakii*'nin çeşitli gıda ve gıda üretim çevrelerinde bulunması, yüksek sıcaklığa direncinin Enterobacteriaceae'nın birçok üyesinden yüksek olması, osmotik basınç ve kuru ortamlarda meydana gelen strese karşı dirençli olması, kuru ortamlarda 2 yıldan fazla yaşayabilmesi ve abiyotik materyallere tutunup biofilm oluşturabilmesi dolayısıyla risk düzeyi yüksek ürünlerin üretiminde bazı tedbirlerin alınması gerekmektedir. Gıda kaynaklı *C. sakazakii* enfeksiyonlarını önlemede önem arz eden tedbirler, hammaddede olası kontaminasyon seviyesinin kontrol altına alınmasına

yönelik tedbirler; çiğ süt, diğer hammadde ve ingrediyenlerin ısıtılması sırasında sayının azaltılmasının kontrol altına alınması; ısıtım sonrası kontaminasyonlardan kaçınmak; mikrobiyolojik kriterlere uymak; *C. sakazakii* enfeksiyonu ile ilişkili olan toz bebek mamaları ile ilgili limitler koymak; riskli gıdaların etiket bilgilerinde depolama, tüketime hazırlama ve sonrasında uyulması gereken kuralların açıklanması şeklindedir.

## KAYNAKLAR

- Al-Holy MA., Lin M., Al-Qadiri HM., Rasco, BA., 2008. A comparative study between overlay method and selective-differential media for recovery of stressed *Enterobacter sakazakii* cells from infant formula. *Food Microbiol.*, 25, 22-28.
- Al-Nabulsi A., Osaili TM., Al-Holy MA., Shaker RR., Ayyash MM., Olaimat AN., Holley, RA., 2009. Influence of desiccation on the sensitivity of *Cronobacter* spp. to lactoferrin or nisin in broth and powdered infant formula. *Int. J. Food Microbiol.*, 136, 221-226.
- Arroyo C., Condon S., Pagan R., 2009. Thermobacteriological characterization of *Enterobacter sakazakii*. *Int J Food Microbiol.*, 136, 110-118.
- Beuchat LR., Kim H., Gurtler JB., Lin LC., Ryu JH., and Richards GM., 2009. *Cronobacter sakazakii* in foods and factors affecting its survival, growth and inactivation. *Int. J. Food Microbiol.*, 136, 204-213.
- Biering G., Karlsson S, Clark NC., Jonsdottir KE., Ludvigsson P., Steingrimsson O., 1989. Three cases of neonatal meningitis caused by *Enterobacter sakazakii* in powdered milk. *J. Clin. Microbiol.*, 27, 9, 2054-2056.
- Block C., Peleg O., Minster N., Bar-Oz B., Simhon A., Arad I., Shapiro M., 2002. Cluster of neonatal infections in Jerusalem due to unusual biochemical variant of *Enterobacter sakazakii*. *Europ. J. Clin Microbiol. & Dis.*, 21, 8, 613-616.
- Bowen AB., Braden, CR., 2008. *Enterobacter sakazakii* disease and epidemiology. In: *Enterobacter sakazakii*, Ed. By: Jeffrey M. Farber, and Stephen J. Forsythe. Page 101-125, ASM Press, Washington.
- Burdette JH., Santos C., 2000. *Enterobacter sakazakii* brain abscess in the neonate: the importance of neuroradiologic imaging. *Pediatr. Radiol.*, 30, 33-34.
- Clark NC., Hill BC., O'Hara CM., Steingrimsson O., Cooksey RC., 1990. Epidemiological typing of *Enterobacter sakazakii* in two neonatal nosocomial outbreaks. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 13, 467-472.
- Dauga C., Breeuwer P., 2008. Taxonomy and physiology of *Enterobacter sakazakii*. In: *Enterobacter sakazakii*, Ed By: Jeffrey M. Farber and Stephen J. Forsythe. Page 1-26, ASM Press, Washington.
- Druggan P., Iversen C., 2009. Culture media for the isolation of *Cronobacter* spp. *Int J. Food Microbiol.*, 136, 169-178.
- Fanning S., Forsythe, S., 2008. Isolation and identification of *Enterobacter sakazakii*. In: *Enterobacter sakazakii*, Ed By: Jeffrey M. Farber and Stephen J. Forsythe. page 27-59, ASM Press, Washington.
- Farber JM., Pagotto F., Cordier JL., 2008. Regulatory aspects. In: *Enterobacter sakazakii*, Ed By: Jeffrey M. Farber and Stephen J. Forsythe. Page 235-253, ASM Press, Washington.
- Farmer JJ., Asbury MA., Hickman FW., Brenner DJ., 1980. The *Enterobacteriaceae* study group, *Enterobacter sakazakii*: A new species of *Enterobacteriaceae* isolated from clinical specimens. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 30, 3, 569-584.
- Farmer JJ., Davis BR., Hickman-Brenner FW., McWhorter A., Huntley-Carter JP., Asbury MA., Riddle C., Wathen-Grady HG., Elias C., Fanning JR., Steigerwalt AG., O'Hara CM., Morris GK., Smith PB., Brenner DJ., 1985. Biochemical identification of new species and biogroups of *Enterobacteriaceae* isolated from clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.*, 21, 1, 46-76.
- FDA., 2002a. FDA warns about possible *Enterobacter sakazakii* infections in hospitalized newborns fed powdered infant formulas [http:// www.cfsan.fda.gov/~lrd/tpinf.html](http://www.cfsan.fda.gov/~lrd/tpinf.html). April 12.
- FDA., 2002b. Isolation and enumeration of *Enterobacter sakazakii* from dehydrated powdered infant Formula. [http:// www.cfsan.fda.gov/~com/mmesakaz.html](http://www.cfsan.fda.gov/~com/mmesakaz.html). July 2002, Revised August 2002;
- Forsythe SJ., 2005. *Enterobacter sakazakii* and other

- bacteria in powdered infant milk formula. *Matern. Child. Nutr.*, 1, 44-50.
- Gurtler JB., Kornacki JL., Beuchat LR., 2005. *Enterobacter sakazakii*: A coliform of increased concern to infant health. *Int. J. Food. Microbiol.*, 104, 1-34.
- Hawkins RE., Lissner CR., Sanford JP., 1991. *Enterobacter sakazakii* bacteremia in adult. *South. Med. J.*, 84, 6, 793-795.
- Hoque A., Ahmed T., Shahidullah M., Hossain A., Mannan A., Noor K., Nahar K., Ilias M., Ahmed D., 2010. Isolation and molecular identification of *Cronobacter* spp. from powdered infant Formula (PIF) in Bangladesh. *Int. J. Food. Microbiol.*, 142, 375-378.
- Hurrel E., Kucerova E., Loughlin M., Caubilla-Barron J., Forsythe SJ., 2009. Biofilm formation on enteral feeding tubes by *Cronobacter sakazakii*, *Salmonella* serovars and other *Enterobacteriaceae*. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 136, 227-231.
- ISO., 2006. Milk and Milk Products-Detection of *Enterobacter sakazakii*. Technical Specification, ISO/TS 22964.
- Iversen C., Forsythe SJ., 2003. Risk profile of *Enterobacter sakazakii*, an emergent pathogen associated with infant milk formula. *Trends Food Sci. Technol.*, 14, 443-454.
- Iversen C., Forsythe S., 2004. Isolation of *Enterobacter sakazakii* and other *Enterobacteriaceae* from powdered infant formula milk and related products. *Food Microbiol.*, 21, 771-777.
- Iversen C., Druggan P., Forsythe SJ., 2004a. A selective differential medium for *Enterobacter sakazakii*. *Int. J. Food Microbiol.*, 96, 133-139.
- Iversen C., Lane M., Forsythe SJ., 2004b. The growth profile, thermotolerance and biofilm formation of *Enterobacter sakazakii* grown in infant formula milk. *Lett. Appl. Microbiol.*, 38, 378-382.
- 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. *malonaticus*, subsp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov. and *Cronobacter* genomospecies I. *BMC Evol. Biol.*, 7, 64.
- Iversen C., Mullane N., Mccardel B., Tall BD., Lehner A., Fanning S., Stephan R., Joosten H., 2008. *Cronobacter* gen. nov., a new genus to accommodate the biogroups of *Enterobacter sakazakii*, and proposal of *Cronobacter sakazakii* gen. nov., comb. nov., *Cronobacter malonaticus* sp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov., *Cronobacter* genomospecies 1, and of three subspecies, *Cronobacter dublinensis* subsp. *dublinensis* subsp. nov., *Cronobacter dublinensis* subsp. *lausannensis* subsp. nov. and *Cronobacter dublinensis* subsp. *lactaridi* subsp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Micr.*, 58, 1442-1447.
- Joosten H., Marugg J., Stephan R., Klijn A., Jackson T., Iversen C., 2008. A rapid and reliable alternative to ISO 21528-1:2004 for detection of *Enterobacteriaceae*. *Int. J. Food Microbiol.*, 125, 344-346.
- Kandhai MC., Reij MW., Gorris LGM., Guillaume-Gentil O., Van Schothorst M., 2004a. Occurrence of *Enterobacter sakazakii* in food production environments and households. *The Lancet*, 363 (9402), 39-40.
- Kandhai MC., Reij MW., van Puyvelde K., Guillaume-Gentil O., Beumer RR., van Schothorst M., 2004b. A new protocol for the detection of *Enterobacter sakazakii* applied to environmental samples. *J. Food Protect.*, 67, 1267-1270.
- Kandhai MC., Heuvelink AE., Reij MW., Beumer RR., Dijk R., van Tilburg JJHC., van Schothorst M., Gorris LGM., 2010. A study into occurrence of *Cronobacter* spp. in the Netherlands between 2001 and 2005. *Food Cont.*, 21, 1127-1136.
- Lai KK., 2001. *Enterobacter sakazakii* infections among neonates, infants, children and adults. *Medicine*, 80, 2, 113-122.
- Lampel KA., Chen Y., 2009. Method for the isolation and detection of *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter*) from powdered infant formula. *Int. J. Food. Microbiol.*, 136, 179-184.

- Leclercq A., Wanegue C., Baylac P., 2002. Comparison of fecal coliform agar and violet red bile lactose agar for fecal coliform enumeration in foods. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 4, 1631-1638.
- Liu C., Zheng W., Zhang H., Hou Y., Liu Y., 2007. Sensitive and rapid detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula by loop-mediated isothermal amplification method. *J. Food Safety*, 29, 83-94.
- Molloy C., Cagney C., O'Brien S., Iversen C., Fanning S., Duffy G., 2009. Surveillance and characterisation by pulsed-field gel electrophoresis of *Cronobacter* spp. in farming and domestic environments, food production animals and retail foods. *Int. J. Food Microbiol.*, 136, 198-203.
- Muytjens HL., Roelofs-Willems H., Jaspars GHJ., 1988. Quality of powdered substitutes for breast milk with regard to members of the family Enterobacteriaceae. *J. Clin. Microbiol.*, 26, 4, 743-746.
- Nazarowec-White M., Farber JM., 1997a. *Enterobacter sakazakii*: A review. *Int. J. Food Microbiol.*, 34, 103-113.
- Nazarowec-White M., Farber JM., 1997b. Incidence, survival, and growth of *Enterobacter sakazakii* in infant formula. *J. Food Protect.*, 60, 3, 226-230.
- Nazarowec-White M., Farber JM., 1997c. Thermal resistance of *Enterobacter sakazakii* in reconstituted dried-infant formula. *Lett. Appl. Microbiol.*, 24, 9-13.
- Nazarowec-White M., Farber JM., 1999. Phenotypic and genotypic typing of food and clinical isolates of *Enterobacter sakazakii*. *J. Med. Microbiol.*, 48, 559-567.
- Oh SW., Kang DH., 2004. Fluorogenic selective and differential medium for isolation of *Enterobacter sakazakii*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70, 5692-5694.
- Osaili T., Forsythe S., 2009. Desiccation resistance and persistence of *Cronobacter* species in infant formula. *Int. J. Food Microbiol.*, 136, 214-220.
- Pagotto F., Farber JM., Lenati R., 2008. Pathogenicity of *Enterobacter sakazakii*. In: *Enterobacter sakazakii*, Ed By: Jeffrey M. Farber, Stephen J. Forsythe. Page. 127-144, ASM Press, Washington.
- Reich F., König R., von Wiese W., Klein G., 2010. Prevalence of *Cronobacter* spp. in powdered infant formula processing environment. *Int. J. Food Microbiol.*, 140, 214-217.
- Schmid M., Iversen C., Gontia I., Stephan R., Hofmann A., Hartmann A., Jha B., Eberl L., Riedel K., Lehner A., 2009. Evidence for a plant-associated natural habitat for *Cronobacter* spp. *Res. Microbiol.*, 160, 608-614.
- Skovgaard N., 2005. Current topics in food microbiology. *Int. J. Food Microbiol.*, 99, 107-111.
- Simmons BP., Gelfand MS., Hass M., Metts L., Ferguson J., 1989. *Enterobacter sakazakii* infections in neonates associated with intrinsic contamination of a powdered infant Formula. *Infect. Cont. Hosp. Epidemiol.*, 10, 9, 398-401.
- Terragno R., Salve A., Pichel M., Epsztejn S., Brengi S., Binsztejn N., 2009. Characterization and subtyping of *Cronobacter* spp. from imported powdered infant formulae in Argentina. *Int. J. Food Microbiol.*, 136, 193-197.
- Townsend S., Forsythe SJ., 2008. The neonatal intestinal microbial flora, immunity, and infections. In: *Enterobacter sakazakii*, Ed By: Jeffrey M. Farber, Stephen J. Forsythe. Page 1-26, ASM Press, Washington.
- van Acker JV., Smet FD., Muyldermans G., Bougateg A., Naessens A., Lauwers S., 2001. Outbreak of necrotizing enterocolitis associated with *Enterobacter sakazakii* in powdered milk formula. *J. Clin. Microbiol.*, 39, 1, 293-297.
- Wan-Ling H., Chang CH., Chou CC., 2010. Heat shock effects on the viability of *Cronobacter sakazakii* during the dehydration, fermentation, and storage of lactic culture milk products. *Food Microbiol.*, 27, 280-285.
- Weber C., Stephan R., Druggan P., Joosten H., Iversen C., 2009. Improving the enrichment procedure for Enterobacteriaceae detection. *Food Microbiol.*, 26, 565-572.
- Willis J., Robinson JE., 1988. *Enterobacter sakazakii* meningitis in neonates. *Pediatr. Infect. Dis J.*, 7, 196-199.