

Enterobacter sakazakii* ALIAS *Cronobacter sakazakii* – NOVÁ HROZBA?*KATEŘINA DEMNEROVÁ
a JARMILA PAZLAROVÁ***Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-
technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha
jarmila.pazlarova@vscht.cz*

Došlo 5.2.09, přijato 2.4.09.

Klíčová slova: *Enterobacter sakazakii*, *Cronobacter saka-
zakii*, patogen, sušená mléčná výživa, D-hodnota**Obsah**

1. Úvod
2. Historie
3. Taxonomie
4. Charakteristika růstu
5. Biochemická charakteristika
6. Výskyt *Enterobacter sakazakii*
7. Odolnost k vysychání
8. Měření tepelné odolnosti
9. Patogenita
10. Závěr

1. Úvod

Enterobacter sakazakii (*Cronobacter sakazakii*) je gramnegativní tyčinka náležící do čeledi *Enterobacteriaceae*. Jedná se o oportunního patogena, který napadá převážně novorozence a imunitně oslabené jedince a je spojen se závažným onemocněním nekrotizující enterokolitidy, meningitidy a otravy s výjimečně vysokou mírou úmrtnosti až 80 %. Ve většině případů byla nákaza *E. sakazakii* spojená s konzumací mléčné kojenecké výživy.

Sušená mléčná strava není sterilní produkt a vysoká odolnost *E. sakazakii* k vysoušení zaručuje jeho kompetitivní výhodu¹ oproti jiným bakteriálním druhům v tomto produktu. Nejběžnější cestou destrukce organismů v potravinách je tepelný záhřev, a proto poznatky o tepelné odolnosti organismu se tak stávají nejdůležitějšími parametry pro zajištění nezávadných potravin a snížení rizika nákazy.

Nezbytnými poznatky pro epidemiologické studie je správná identifikace a odlišení *Enterobacter sakazakii* od blízce příbuzných druhů čeledi *Enterobacteriaceae* a také přesné určení patogenu způsobující onemocnění. Ukázalo se, že standardní biochemické soupravy pro rozlišení *Ente-*

robacter sakazakii mohou poskytovat falešně pozitivní a stejně tak falešně negativní výsledky². Genetické metody tedy slouží jako mocný nástroj pro správnou identifikaci organismu a zjištění vzájemných evolučních vztahů. Současné metody sekvenování DNA jsou vysoce účinné, takže jsou stanoveny kompletní nukleotidové sekvence genomů mnoha bakterií. Pro určení druhové příslušnosti však postačují sekvence genu pro malou ribosomální podjednotku 16S rRNA.

2. Historie

Již ve dvacátých letech bylo zaznamenáno, že žlutě zbarvená koliformní bakterie způsobila septikémii u novorozence. Až mnohem později, v roce 1961 (cit.³) byl popsán další případ, kdy „žlutě zbarvený *Enterobacter cloacae*“ způsobil novorozeneckou meningitidu. Brenner a spol.⁴ v roce 1977 poprvé užíli nynějšího názvu bakterie *Enterobacter sakazakii* pojmenované podle slavného japonského mikrobiologa Riichiho Sakazakiho.

Do dnešního dne bylo popsáno několik případů z jednotek intenzivní péče pro kojence, kdy *Enterobacter sakazakii* způsobil závažná onemocnění typu otravy (seps), zánětu mozkových blan (meningitida) nebo nekrotizujícího zánětu trávicího traktu (enterokolitida). Ačkoliv v mnoha případech zůstal zdroj infekce neznámý, ve stoupajícím počtu hlášených případů se zjistila souvislost se sušenou kojeneckou stravou.

V roce 2002 ICMSF⁵ (International Commission on Microbiological Specification for Foods – Mezinárodní komise pro mikrobiologickou specifikaci potravin) označila *Enterobacter sakazakii* jako vážně nebezpečný organismus pro vyhrazenou část populace, ohrožující její život a způsobující dlouhodobé závažné následky. *Enterobacter sakazakii* se tak zařadil mezi nebezpečné potravinové patogeny vedle *Listeria monocytogenes* nebo *Clostridium botulinum*. V listopadu 2005 vydala Evropská Komise Nařízení č. 2073/2005 a v tomto znění pak další Nařízení 1441/2007 o mikrobiologických kritériích pro potraviny, ze kterého vyplývá nutnost sledovat přítomnosti *Enterobacter sakazakii* v sušené dětské výživě a podobných sušených přípravcích určených kojencům do stáří šesti měsíců⁵.

3. Taxonomie

Až do roku 1980 se věřilo, že se jedná o žlutě zbarveného *Enterobacter cloacae*, teprve Farmer a spol.⁶ dokázali základní rozdíly a definovali nový druh – *Enterobacter sakazakii*. Reklasifikace byla uskutečněna na základě DNA-DNA hybridizace, produkce žlutého pigmentu

a biochemických reakcí⁶. Při srovnání *E. sakazakii* se zástupci rodů *Enterobacter* a *Citrobacter* na základě DNA-DNA hybridizace se ukázala 50% podobnost s oběma rody. Podle fenotypových rysů bližších *E. cloacae* byl *E. sakazakii* přiřazen do rodu *Enterobacter*, čeledi *Enterobacteriaceae*⁷. V původní studii byly kmeny rozděleny podle biochemických vlastností do 15 bioskupin.

Do dnešní doby neexistuje jednotné mínění o zařazení *E. sakazakii* do rodu *Enterobacter*. Zatímco analýza plné délky genu pro 16S rRNA poukázala na dva fylogeneticky odlišné rody v rámci druhu *Enterobacter sakazakii*⁸, tak genotypizace podle 16S rRNA společně s analýzou genu pro hsp60 ukázala, že kmeny *E. sakazakii* tvoří minimálně čtyři genetické skupiny s většinou kmenů náležících do první skupiny.

Tyto zmatky v taxonomii se staly výzvou pro Carol Iversen a spol.⁹, kteří provedli analýzu 210 kmenů *E. sakazakii*. Na základě typizace podle f-AFLP, ribotypizace, analýzy genu pro malou ribosomální podjednotku 16S rRNA, jejíž celá sekvence je tvořena více než 1300 páry bází, a DNA-DNA hybridizace navrhli reklasifikaci tohoto organismu do rodu *Cronobacter*, který by obsahoval pět různých skupin a řadil by se mezi *Enterobacteriaceae*. Název rodu vychází z řecké mytologie, ve které se praví, že bůh Cronos spolknul své děti krátce po jejich narození, což symbolizuje vysokou úmrtnost novorozenců způsobenou tímto organismem. Důvod, proč organismy zařazené do druhů *Cronobacter sakazakii*, *Cronobacter turicensis*, *Cronobacter malonicus*, *Cronobacter mytjesii* a *Cronobacter dublinensis*, jsou v tomto sdělení označovány jako *Enterobacter sakazakii*, je ten, že současná platná potravinářská legislativa vycházející z nařízení Evropské Komise používá dosud tento název.

4. Charakteristika růstu

Enterobacter sakazakii je gram-negativní rovná tyčinka 0,5–1,5 μm široká, pohyblivá, díky peritrichálním bičíkům. Je to neselektivní fakultativní anaerob, který na neselektivních půdách tvoří žluté nebo bezbarvé kolonie. Čerstvě izolovaná bakterie tvoří kolonie dvou různých morfologií¹⁰. Jeden typ se popisuje buď jako suchý nebo mukoidní, vroubkovaný a po dotknutí očkovací jehlou sklouzávajícím zpátky na agar. Tato vlastnost se přisuzuje heteropolysacharidovému pouzdru, které umožňuje snad-

nější přichycení k povrchu a tvorbu biofilmu. Druhý morfologický typ je popisován jako hladký a snadno odstranitelný pomocí očkovací jehly. Při růstu v bujónu má tendenci sedimentovat. Bakterie vykazuje značnou odolnost ke kyselému pH a extrémně vysokou odolnost k vysoušení a tepelnému záhřevu.

Enterobacter sakazakii roste v širokém rozmezí teplot, přičemž minimální teplota růstu je 36 °C, maximální 47,6 °C a optimální růstová teplota činí 39,4 °C (cit.¹¹). Mnoho výzkumných pracovišť se zabývá růstovým profilem *E. sakazakii* v mléčné výživě a zaznamenaly doby zdvojení bakterie při různých teplotách, jak popisuje tabulka I.

5. Biochemická charakteristika

Produkce žlutého pigmentu spolu s α -glukosidasovou aktivitou jsou nejdůležitějšími faktory odlišujícími *Enterobacter sakazakii* od dalších kmenů rodu *Enterobacter*. Organismus redukuje nitrát, využívá jako zdroj uhlíku citrát, hydrolyzuje eskulin a arginin, dekarboxyluje L-ornithin. Tvoří kyseliny z D-glukosy, D-sukrosy, D-rafinosy, D-melibiosy, D-cellobiosy, D-mannitolu, D-mannosy, L-rhamnosy, L-arabinosy, D-trehalosu, galakturonátu a D-maltosu. Později se ovšem prokázalo, že produkce žlutého pigmentu je nestabilní se zvyšujícím se počtem pasážování a nemůže proto sloužit k věrohodné identifikaci⁶. Vyšší produkce pigmentu se projevuje při teplotách kultivace nižších než 36 °C, s optimem při 25 °C (cit.¹⁰). Za hlavní rozdíl mezi *E. sakazakii* a dalšími *Enterobacteriaceae* se dříve považovala jeho neschopnost fermentovat D-sorbitol a schopnost produkovat extracelulární deoxyribonukleasu⁶. *Enterobacter sakazakii* dává pozitivní reakci na produkci acetoinu (Voges-Proskauerova reakce). Tvorba indolu je závislá na příslušnosti k biotypu (viz nové druhy rodu *Cronobacter*).

První sekvenovaný genom *Enterobacter sakazakii* byl zveřejněn v druhé polovině roku 2007. Jedná se o sbírkový kmen *Enterobacter sakazakii* ATCC BAA-894, který pocházel z kojenecké výživy, jakou bylo krmeno hospitalizované dítě, u něhož propukla infekce. Jeho genom je tvořen cirkulární DNA délkou 4,4 Mbp, kódující 4277 proteinů a ze dvou plazmidů. Obsah guaninu a cytosinu (G+C) byl stanoven pro rod *Cronobacter* 56,7 % (cit.¹²).

6. Výskyt *Enterobacter sakazakii*

6.1. Zdroje z potravin a z prostředí

Vzhledem k infekcím, které *E. sakazakii* způsobuje u novorozenců, se jeho výskyt často spojuje s kontaminací sušené mléčné výživy. Vyskytuje se však v různém prostředí, jako je voda, půda a zelenina, které jsou předpokládaným hlavním zdrojem kontaminace¹³. Jako sekundární zdroj přenosu mohou sloužit mouchy nebo hlodavci¹⁶.

Tabulka I

Generační doba (h) *E. sakazakii* při různých teplotách inkubace

	Generační doba [h] při teplotě:					Lit.
	6 °C	10 °C	21 °C	23 °C	37 °C	
	13,70		1,70		0,37	31
		5,52		0,65		20

Hamilton a spol.¹⁴ izoloval *E. sakazakii* ze střeva larvy *Stomoxys calcitrans*, která se živí krví hospodářských zvířat i lidí. Organismus byl izolován z několika zdrojů zahrnující základní potraviny jako sýr, chléb, tofu, koření a bylinky, rýže a maso. Studie také ukázaly, že *E. sakazakii* se vyskytuje v suchém a prašném prostředí továren na výrobu čokolády, zpracování obilovin, výrobu těstovin, zpracování a balení koření a také v domácím prostředí¹⁵. Jeho hlavní rezervoár se ovšem stále nepodařilo určit. Miriam Friedemann¹⁶ v roce 2007 shromáždila data o výskytu *E. sakazakii* v potravinách a nápojích, které nejsou v kategorii dětské výživy nebo sušeného mléka. Organismus byl nalezen v mnoha typech cereálních a luštěninových potravin, dále v prášku pro přípravu ledového čaje a v několika typech koření. Rovněž byl *E. sakazakii* nalezen v krájených čerstvých ovocných a zeleninových salátech, v různých typech ořechů a bramborech. Pozitivně testované masné výrobky zahrnovaly např. párky, mleté maso, kůže drůbeže čerstvě po porážce a želatinu. Mléčné výrobky byly pozitivní v případě testování syrového mléka a měkkých sýrů. V roce 2007 publikovali japoňští autoři¹⁷ H. Asakura a spol. studii, kde po mikrobiologických rozbořech 2000 typů potravin izolovali 30 kmenů, které přiřadili do *E. sakazakii*. Mezi pozitivně testovanými potravinami byly tři typy sušené dětské mléčné výživy, ale také rýže, mražený chléb, pšeničná mouka, práškový agar, různé výrobky ze soji, pohanková mouka, česnek a další potraviny, jejichž společným znakem byl rostlinný původ.

6.2. Klinické zdroje

Klinické izoláty *Enterobacter sakazakii* z infikovaných pacientů často pocházely z centrální nervové soustavy, krve, slin, krku, nosu, stolice, střeva, kůže, moči, očí a uší¹¹.

Bohužel kontaminace nemocničního prostředí a nedostatečné hygienické zabezpečení přípravy dětské mléčné stravy zůstává permanentním problémem. V mnoha případech bylo společným jmenovatelem onemocnění kontaminované nádoby pro přípravu mléčné výživy jako lžice, míchadlo a také žínka na umývání nádobí¹⁰. Nebezpečí tkví zejména ve schopnosti bakterie tvořit biofilm, tím se stává mnohem odolnější vůči čistícím prostředkům i zvýšené teplotě mytí a může tak přežívat na nemocničním nádobí po dlouhou dobu.

6.3. Sušená mléčná výživa

Infekce způsobená *Enterobacter sakazakii* byla poprvé spojena s kojeneckou mléčnou výživou v roce 1983 (cit.¹⁸). V bývalém Československu byly ve stejných letech izolovány čtyři kmeny *E. sakazakii* ze sušeného mléka a dva ze sušené kojenecké výživy¹⁹. V jednom z nejvýznamnějších průzkumů mléčné výživy²³ se zjistilo, že 52,2 % ze 141 sušených mléčných výživ ze 35 zemí světa bylo pozitivních na kmeny rodu *Enterobacteriaceae*, z toho 14 % obsahovalo *E. sakazakii*, který se umístil na třetím místě nejčastěji izolované bakterie po *E. agglomerans* a *E. cloacae*.

Při testování²⁰ 120 plechovek mléčné výživy od pěti různých výrobců bylo zjištěno, že 6,7 % z nich bylo kontaminováno, množství *E. sakazakii* buněk však často představovalo pouze 0,36 KTJ/100 g. Při takto nízké koncentraci kontaminace (méně než 1 buňka/100 g) je nepravděpodobné, že by mléčná výživa byla příčinou infekce. Ovšem při nedbalém zacházení a nedostatečných hygienických podmínkách se může riziko požití buněk *E. sakazakii* zvýšit až 30 000× (FAO-WHO, 2004, cit.²¹). Prokazatelnou spojitost mezi nákazou *E. sakazakii* a sušenou mléčnou stravou v roce 2002 oznámilo americké Centrum pro kontrolu nemocí²² (CDC – Center for Disease Control).

6.4. Výroba sušené mléčné výživy

Sušená mléčná výživa není sterilní produkt. První sušená mléčná výživa se na trhu objevila téměř před 100 lety jako náhrada mateřského mléka. Aby dosahovala stejné nutriční hodnoty, jakou má lidské mateřské mléko, je zapotřebí kravské mléko upravit snížením obsahu minerálů a proteinů, zvýšením podílu Ca/P, zvýšením množství sacharidů a proteinů ze syrovátky. Nakonec se přidávají vitamíny a upravuje se tukové složení²³.

Sušená mléčná výživa může být vyráběna dvěma způsoby, „suchou“ a „vlhkou“ cestou, které se často vzájemně kombinují podle rozpustnosti přidávaných složek. Rozpustné látky se přidávají do tekuté fáze, zatímco méně rozpustné až po ošetření směsi horkým vzduchem. Při výrobě suchou cestou se nízkotučné mléko pasteruje a odpařuje, poté se přimíchají další přísady, jako např.: esenciální mastné kyseliny, syrovátka, vitamíny, emulzifikátory a stabilizátory. Celá tato směs se zahřívá na 110 °C po dobu 60 s a pak se sprejově suší. Při této metodě hrozí vyšší nebezpečí bakteriální kontaminace a další nevýhodou je nestejnoměrné promíchání všech přísad. Při vlhké výrobě se obě složky (nízkotučné mléko a přísady) ošetří při 80–82 °C po dobu 20 s. Poté se směs zahřívá na 107 až 110 °C po dobu 60 s a tato tekutá hmota se koncentruje užitím odparky s tenkým filmem. Koncentrát se opět zahřívá na 80 °C a konečně sprejově suší²³. Kritická místa během výroby nejnáchylnější k mikrobiální kontaminaci se nachází mezi sprejovým sušením, balením produktu a dodáváním látek v pevném stavu. Předpokládá se ovšem, že na kontaminaci konečného produktu má větší vliv prostředí továrny než samotný výrobní proces.

Na základě stanoviska Evropského úřadu pro bezpečnost potravin (EFSA) bylo dle Nařízení komise č. 2073/2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny začleněn pro kojeneckou počáteční a pokračovací výživu požadavek nepřítomnosti bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* v 10 g produktu. Zjištění přítomnosti *E. sakazakii* vyžaduje cílené vyšetření 10 g kojenecké výživy ze 30 vzorků. Rovněž je tímto nařízením uloženo výrobcům sušené kojenecké výživy provádět kontroly výrobního prostředí zaměřené na zjišťování bakterií čeledi *Enterobacteriaceae*⁵.

Pro detekci *E. sakazakii* ve vzorcích sušené mléčné výživy byla Mezinárodní organizací pro normalizaci (ISO

– International Standards Organisation) přijata kultivační metoda (ČSN P ISO/TS 22964:2006) založená na selektivním nabohacování mikrobiální kultury²⁴.

7. Odolnost k vysychání

Sušená mléčná výživa má velice nízkou aktivitu vody (a_w) kolem 0,2. Přežití mikroorganismů v takto nepříznivých podmínkách vyžaduje vysokou odolnost k osmotickému stresu. *Enterobacter sakazakii* má neobvyklou schopnost přežít i ve velmi suchých podmínkách (v mléčném prášku až 12 měsíců)²⁵. Musí proto existovat jistý mechanismus, jak se *E. sakazakii* vyrovnává s osmotickým stresem. Iversen a Forsythe¹³ se domnívají, že zodpovědnost za přežívání v takto nehostinných podmínkách nese pouzdro, jak je popsáno dále.

Bakterie se proti zvyšování osmolarity brání rychlou akumulací iontů, zejména K^+ , následně hromaděním rozpuštěných látek, jako je prolin, glycin, betain a trehalosa. Sloučeniny jako trehalosa, neredukující disacharid glukosy, může nahradit schránku tvořenou vodou kolem makromolekul, která se ztrácí během sprejového sušení a chrání tak buňky před zničením²⁸. Předpokládá se, že trehalosa hraje roli zejména ve stabilizaci fosfolipidové membrány a proteinů.

Breeuwer a spol.¹ se zabýval vlivem suchého prostředí na *Enterobacter sakazakii*. V suchých podmínkách se

zvýší koncentrace trehalosy u *Enterobacter sakazakii* víc než pětikrát, zatímco tento jev není pozorován v stacionární fázi buněk *E. coli* za obdobných podmínek. Navíc, přidání trehalosy do kultivačního média zlepšuje schopnost *E. sakazakii* přežít za podmínek sucha. Objasní také genetický princip odolnosti *E. sakazakii* vůči suchým podmínkám. Ukázalo se, že v ochraně bakterie hraje roli sedm genů z „heat shock“ regulonu, čtyři z regulonu cyklického AMP receptoru a šest genů, jež jsou odpovědné za syntézu trehalosy a správnou funkci buněčné membrány, jako je biosyntéza lipidů a polysacharidů¹.

Díky přežívání buněk při zvýšené teplotě a schopnosti buněk růst při více než 47 °C, *E. sakazakii* je v kompetitivní výhodě oproti jiným druhům čeledi *Enterobacteriaceae*. *E. sakazakii* se tak stává dominantním v teplém a suchém prostředí, např. v blízkosti sušících zařízení ve výrobnách sušené mléčné výživy. Jeho výskyt v tomto prostředí zvyšuje riziko post-procesní kontaminace³¹.

8. Měření tepelné odolnosti

Možnost života každého mikroorganismu je ohraničena třemi základními teplotami a to T_{min} , která udává minimální teplotu při které organismus ještě roste, dále je to T_{opt} , která udává teplotu, při které je růst optimální a T_{max} pak označuje nejvyšší teplotu, při které organismus je ještě

Tabulka II

Porovnání D-hodnot^e získaných měření v různých laboratořích

Kmeny <i>E. sakazakii</i>	Médium ^{a,b,c}	D ₅₆	D ₅₈	D ₆₀	z-hodnota ^f	Lit.
Klinické izoláty	SMV	10,91±1,52	5,45±0,46	3,06±0,12	5,6	(Nazarowec-White and Farber, 1997a)
Potravinové izoláty	SMV	9,75±0,47	3,44±0,35	2,15±0,07		
<i>E. sakazakii</i> 1387-2	PBS	2,4	0,48		3,1	
<i>E. sakazakii</i> 1387-2	SMV		0,50			
<i>E. sakazakii</i> 16	PBS	1,1	0,40		3,6	(Breeuwer a spol., 2003)
<i>E. sakazakii</i> 1360	PBS		0,34			
<i>E. sakazakii</i> 145	PBS		0,27			
<i>E. sakazakii</i> NCTC 11467	TSB	2,7 ± 0,08	1,3 ± 0,28	0,9 ± 0,17	5,8	
S pouzdrém ^d	TSB	1,2 ± 0,01	1,7 ± 0,39	0,2 ± 0,06	5,7	(Iversen and Forsythe, 2004b)
<i>E. sakazakii</i> NCTC 11467	SMV	5,1 ± 0,27	2,6 ± 0,48	1,1 ± 0,11		
S pouzdrém ^d	SMV	3,9 ± 0,06	3,8 ± 1,95	1,8 ± 0,82		
<i>E. sakazakii</i> ATCC 51329			0,51		5,6	(Edelson-Mammel and Buchanan, 2004)
Klinický izolát			9,87			

^a SMV – rozpuštěná sušená mléčná výživa, ^b PBS – fosfátový pufr, ^c TSB – tryptónový sójový bujón, ^d kmen *Enterobacter sakazakii* s pouzdrém, ^e tepelná odolnost bakterií se vyjadřuje jako čas nezbytný k usmrcení 90 % populace při určité teplotě a v daném mediu. Číselné vyjádření tohoto jevu se nazývá D-hodnota (decimal reduction time) a udává se v minutách; ^f z-hodnota je změna teploty, která vyvolá desetinásobnou změnu D

schopen růstu. Pro *E. sakazakii* je T_{\max} 47,6 °C, což znamená, že uchovávání kultur při vyšších teplotách vede k jeho devitalizaci.

Teplná odolnost bakterií se vyjadřuje jako čas nezbytný k usmrcení 90 % populace při určité teplotě a v daném médiu. Číselné vyjádření tohoto jevu se nazývá D-hodnota (decimal reduction time) a udává se v minutách. Testovaná teplota je uvedena jako dolní index, např. D_{60} udává čas nutný pro snížení množství bakterií o jeden řád při 60 °C. Delší čas při dané teplotě znamená vyšší termální rezistenci. Se zvýšením teploty D-hodnota klesá. Tato závislost je exponenciální, neboť při vynesení koncentrace buněk v závislosti na čase v semilogaritmickém uspořádání získáme přímku. Z toho lze odvodit další významný parametr tepelného působení: z-hodnota je změna teploty, která vyvolá desetinásobnou změnu D. Tabulka II udává tyto hodnoty pro různé kmeny *E. sakazakii*.

Různorodost výsledků D-hodnot lze vysvětlit širokým rozmezím tepelné odolnosti v rámci druhu *Enterobacter sakazakii*. Srovnání termální rezistence u 12 kmenů *E. sakazakii* potvrdilo, že tato vlastnost je u různých kmenů vysoce variabilní. Vzhledem k této variabilitě by bylo možné rozdělit *E. sakazakii* na dvě skupiny podle dvou odlišných fenotypů²⁶ a toto rozdělení by vysvětlilo rozdíly v tepelné odolnosti u různých kmenů *E. sakazakii*. Dále při pátrání po tomto fenoménu²⁷ byl identifikován protein, vyskytující se pouze v tepelně-tolerantních kmenech. Tento protein byl sekvenován a označen jako homologní s proteinem *Methylobacillus flagellatus*, což je methylo- trofni organismus, který dokáže přežít vysoké teploty a nenáleží do rodiny *Enterobacteriaceae*.

Při hledání genetické charakterizace termální tolerance¹⁷ byly izoláty *E. sakazakii* rozděleny do tří skupin: na rezistentní, středně citlivé a citlivé. Po 90 minutách záhřevu při 60 °C rezistentní kmeny klesly z původních 10^8 na 10^4 , zatímco u citlivých kmenů se po inkubaci na miskách neobjevil žádný nárůst. Analýza genové exprese genů pro „heat-shock“ protein *groEL*, histone-like-proteinu *hnsB* a translačního iniciačního faktoru *infB* ukázala, že míra exprese *groEL* a *hnsB* nebyla specifická, zatímco exprese *infB* byla nápadně zvýšena u tepelně odolných kmenů. Gen *infB* by tak mohl sloužit jako cílová sekvence pro rozlišení tepelně odolných a tepelně citlivých kmenů *E. sakazakii*.

9. Patogenita

Druhy rodu *Enterobacter* způsobují až 50 % všech nosokomiálních infekcí, nejčastěji u imuno-deficientních jedinců nebo starších pacientů. Mimo *E. sakazakii* jsou dalšími častými druhy rodu *Enterobacter* způsobující infekční onemocnění např.: *E. meningitis*, *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *E. agglomerans*, *E. hormechele* a *E. gergovial*.

Nemoci způsobené *E. sakazakii* u dospělých jedinců zahrnují rozsáhlé spektrum příznaků, od zánětu spojivek, zánětu žlučového a močových cest přes záněty v ránách až po zápal plic. Do současnosti bylo evidováno devět případů infekce *E. sakazakii* u dospělých, přičemž se vždy jed-

nalo o slabé, imuno-deficientní jedince nebo starší občany¹¹. Riziková skupina novorozenců jsou předčasně narození jedinci s nízkou porodní váhou a potlačenou imunitou ve věku od tří dnů do čtyř let¹⁴. Navíc žaludek novorozenců, zejména předčasně narozených, nemá tak kyselé pH jako žaludek dospělých, a to napomáhá přežití buněk *Enterobacter sakazakii*²¹.

Novorozenecká onemocnění způsobená *E. sakazakii* se vyskytují vzácně, ale mají závažný a rychlý průběh s vysokým poměrem úmrtnosti. Zahrnují otravu krve (sepsy), zánět mozkových blan (meningitida) a nekrotizující enterokolitidu¹⁴. Mezi lety 1958–2003 bylo zaznamenáno 76 případů nákazy *E. sakazakii* u novorozenců, z toho 19 jedinců nepřežilo.

Zánět mozkových blan nebo-li meningitida u novorozenců může být způsobená několika druhy bakteriálních patogenů, včetně *Enterobacter cloacae*, fylogeneticky velmi blízkého *E. sakazakii*. Onemocnění způsobená *E. sakazakii* se vyznačují velmi vysokým poměrem úmrtnosti¹⁴ 40–80 % a až v 90 % vedoucích k mozkovému abscesu a následné retardaci. Nekrotizující enterokolitida se vyskytuje až 10× častěji u dětí krmených mléčnou výživou oproti těm krmených mateřským mlékem.

Některé kmeny *Enterobacter sakazakii* produkují extracelulární heteropolysacharidové pouzdro, které bakteriím napomáhá k přilnutí k povrchu a tvorbě biofilmu²⁸. Předpokládá se, že ochranné pouzdro také hraje důležitou roli v ochraně proti vysychání, protože polysacharid je vysoce hydratovaný díky inkorporaci značného množství vody²⁹. Analýzou monosacharidů tvořících extracelulární polysacharid byl zjištěn obsah glukosy, galaktosy, fukosy a glukurové kyseliny v poměru 1:1:1:0,8 a stopy mannosy.

Ačkoliv neexistují žádné epidemiologické údaje o hodnotě infekční dávky, Iversen a Forsythe¹³ předpokládali první aproximaci 1000 KTJ (kolonie tvořící jednotky), což je dávka stanovená pro *E. coli*, *Listeria monocytogenes* nebo *Neisseria meningitidis*. Infekční dávka se může lišit podle minulosti organismu, zdravotního stavu hostitelského organismu a typu potravin. Je ovšem velmi nepravděpodobné, že by infekci způsobil nízký počet organismů v sušené mléčné výživě (méně než 0,36 *E. sakazakii* buněk/100 g), z čehož vyplývá, že k nákaze dochází kvůli nedostatečným hygienickým podmínkám přípravy stravy³⁰. Pokud budeme brát v úvahu, že sušená mléčná výživa je kontaminovaná jedinou buňkou, pak podle výpočtu růstové rychlosti by bylo zapotřebí 13 h kultivace při pokojové teplotě, aby bylo dosaženo 1000 KTJ.

10. Závěr

V lednu 2006 experti FAO a WHO³¹ znovu zdůraznili nutnost preventivní strategie pro omezení infekcí *E. sakazakii* z kontaminovaných sušených přípravků pro výživu kojenců. Hlavním úkolem je nutnost vzdělávání na všech úrovních k zajištění bezpečného nakládání, skladování a používání sušené mléčné výživy (powdered infant formula, PIF) včetně omezení zdravotních rizik vyvolaných

její nevhodnou přípravou a používáním. Cílovými osobami jsou pracovníci ve zdravotnictví, rodiče a další poskytovatelé péče jak v nemocnicích, tak ve veřejnosti, neboť infekce vyvolané *E. sakazakii* se vyskytují jak v nemocnicích, tak v domácím prostředí.

Kromě toho byla zdůrazněna nutnost vybudování dohledu a sítě pro rychlou odpověď, která by usnadnila přenos informací mezi klinickými a laboratorními pracovníky na jedné straně a pracovníky orgánů veřejného zdraví a hygieny na straně druhé, s cílem rychlé diagnostiky a rozpoznání onemocnění způsobeného *E. sakazakii* a nalezení zdrojů kontaminace.

Tato práce byla podpořena z prostředků Výzkumných záměrů MŠMT MSM 6046137305 a Národního programu výzkumu II 2B06048.

LITERATURA

- Breeuwer P., Lardeau A., Peterz M., Joosten H. M.: J. Appl. Microbiol. 95, 967 (2003).
- Iversen C., Waddington M., On S. L. W., Forsythe S.: J. Clin. Microbiol. 42, 5368 (2004).
- Urmeney A. M. C., Franklin A. W.: Lancet I, 313 (1961).
- Brenner D. J., Farmer J. J., Hickman F. W., Asbury M. A., Steigerwalt A. G.: US Department of Health, Education and Welfare, Public Health Service, CDC, Atlanta (1977).
- Nariženi Komise (ES) č. 1441/2007 o mikrobiologických kritériích pro potraviny.
- Farmer J. J. III, Asbury M. A., Hickman F. W.: Int. J. Syst. Bacteriol. 30, 569 (1980).
- Nazarowec-White M., Farber J. M.: Int. J. Food Microbiol. 34, 103 (1996).
- Lehner A., Tasara T., Stephan R.: BMC Microbiol. 4, 43 (2004).
- Iversen C., Lehner A., Mullane N., Bidlas E., Cleenwerck I., Marugg J., Fanning S., Stephan R., Joosten H.: BMC Evolution. Biology 7, 64 (2007).
- Gurtler J. B., Kornacki J. L., Beuchat L. R.: Int. J. Food. Microbiol. 104, 1 (2005).
- Kandhai M. C., Reij M. W., Gorris L. G., Guillame-Gentil O., van Schothorst M.: Lancet 363, 39 (2004).
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (staženo 17. 3. 2008).
- Iversen C., Forsythe S. J.: Trends Food Sci. Technol. 14, 443 (2003).
- Hamilton J. V., Lehane M. J., Braig H. R.: Emerg. Infect. Dis. 9, 1355 (2003).
- Kandhai M. C., Reij M. W., Grogno C., van Schothorst M., Gorris L. G., Zwietering M. H.: Appl. Environ. Microbiol. 72, 2721 (2005).
- Friedmann M.: Internat. J. Food Microbiol. 116, 1 (2007).
- Asakura H., Morito-Ishihara T., Yamamoto S., Igimi S.: Microbiol. Immunol. 51, 671 (2007).
- Muytjens H. L., Zanen H. C., Sonderkamp H. J., Koo L. A., Wachsmuth I. K., Farmer J. J.: J. Clin. Microbiol. 18, 115 (1983).
- Postupa R., Aldova E.: J. Hyg., Epidemiol. Microbiol. Immunol. 28, 435 (1984).
- Nazarowec-White M., Farber J. M.: J. Food Protect. 60, 226 (1997).
- FAO/WHO, Ženeva. *Enterobacter sakazakii* and other bacteria in powdered infant formula. Microbiological Risk Assessment Series, No. 6. (2004). <http://www.who.int/foodsafety/micro/meetings/feb2004/en/>
- Centres for Disease Control and prevention (CDC): JAMA 287, 2204 (2002).
- Nazarowec-White M., Farber J. M.: Lett. Appl. Microbiol. 24, 9 (1997).
- Anon. ČSN P ISO/TS 22964, Mléko a mléčné výrobky – Průkaz *Enterobacter sakazakii*, 2006.
- Leslie S. B., Israeli E., Lighthart B., Crow J. H., Crowe L. M.: Appl. Environ. Microbiol. 61, 3592 (1995).
- Edelson-Mammel S. G., Buchanan R. L.: Food Prot. 67, 60 (2004).
- Williams T. L., Monday S. R.: Edolson-Mammel S., Buchanan R., Musser S. M.: Proteomics 5, 4161 (2005).
- Kim H., Ryu J. H., Beuchat L. R.: Appl. Environ. Microbiol. 72, 5846 (2006).
- Lehner A., Stephan R.: J. Food. Prot. 67, 2850 (2004).
- Nazarowec-White M., McKellar R. C., Piyesena P.: Food Res. Int. 32, 375 (1999).
- FAO/WHO Expert Meeting on *Enterobacter sakazakii* and *Salmonella* in powdered infant formula, Rome, 16-20 January 2009. Microbiol. Risk Assessment serie 10.

K. Demnerová and J. Pazlarová (Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology, Prague): ***Enterobacter sakazakii* alias *Cronobacter sakazakii* – A New Menace ?**

This survey informs about the ubiquitous opportunistic pathogen *Enterobacter sakazakii*. Its main biochemical and physiological characteristics including resistance to desiccation and to heat are presented. The newest results of taxonomy based on detailed analysis of 16S rRNA, which led to renaming the organism as *Cronobacter sakazakii*, are mentioned. Majority of *E. sakazakii* outbreaks have been strongly associated with contaminated powdered infant formula (PIF). The *E. sakazakii* contamination of PIF may be due to introduction of the organism during manufacture or may result from the use of contaminated utensils and poor hygiene in the preparation of PIF. According to an EC directive, all PIFs based on milk powder must be tested for the presence of *E. sakazakii*.